

# **NUEVO INTERACTOMA DE LA PROTEÍNA GQ Y SU IMPLICACIÓN EN LA HOMEOSTASIS VASCULAR**

---

**ÁLVARO CABALLERO LOMBRANA**  
**MADRID, 2020**





Universidad Autónoma  
de Madrid

**Programa de Doctorado de Biociencias Moleculares**

## **Nuevo interactoma de la proteína Gq y su implicación en la homeostasis vascular**

**Álvaro Caballero Lombrana**

**Madrid 2020**



**Memoria presentada por la graduado en Biología**

**ÁLVARO CABALLERO LOMBRAÑA**

**para optar al título de**

**DOCTOR EN BIOCIENCIAS MOLECULARES**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. CATALINA RIBAS NÚÑEZ**

**DR. FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ**

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Departamento de Biología Molecular.**  
(Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma Madrid)



**CSIC UAM**



Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección de Federico Mayor Menéndez, Catedrático del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, y de Catalina Ribas Núñez, Profesora Titular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una Ayuda para la Formación del profesorado Universitario (FPU) (FPU14/06670) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y a fondos de la Fundación Severo Ochoa.

El estudiante de doctorado también ha recibido apoyo de becas para la asistencia a congresos (UAM y SEBBM).



*A mis padres*

*A mi hermano*



*“Uno llega a ser grande por lo que lee y no por lo que escribe”*

Jorge Luís Borges

*“Modifications will add to the beautiful  
and harmonious diversity of nature”*

Charles Robert Darwin



## *AGRADECIMIENTOS*

Creo que antes empezar cualquier apartado de esta tesis es necesario escribir este apartado de agradecimientos, aunque desde hace años pensaba en cómo sería este momento y que sería lo que pondría. Es necesario destacar que la tesis además de tener un papel fundamental a nivel académico y profesional tiene un papel esencial en tu formación como persona, ya que todo el esfuerzo y perseverancia que dedicas durante esos años te ayudan a convertirte en un profesional de tu pequeña parte dentro de un campo infinito como es la ciencia. Todo este camino sería imposible realizarlo sin las personas que te llevaron hasta allí, las que te acompañaron durante este recorrido.

En primer lugar, quiero agradecer a Catalina Ribas y a Federico Mayor el haberme dado la oportunidad de unirme al laboratorio 320 y poder formar parte de un gran número de proyectos. No quiero olvidarme de todos los miembros del laboratorio 320, tanto los que ya se fueron como los que están ahora mismo, por todo su apoyo científico y personal.

Es importante agradecer a las diversas instituciones sin las cuales no hubiera podido realizar este trabajo. Gracias al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por ser la fuente principal de financiación, a la Universidad Autónoma de Madrid, Fundación Severo Ochoa y las sociedades SEBBM, GRC por las ayudas para la asistencia a congresos, reuniones y cursos. Gracias al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa y sus servicios científicos. Sin el CBMSO, tanto por su gestión de la tan odiada burocracia como por proveer de unos servicios científicos excelentes, este trabajo no sería posible. En especial quiero agradecer a los servicios de Microscopía y de Citometría, por sus ganas de colaborar y enseñarnos las diferentes técnicas y herramientas tan necesarias; y, sobre todo dar las gracias a todo el personal del animalario, en especial a Estefanía y Laura. Tampoco me puedo olvidar que durante casi 10 años la UAM ha sido mi casa.

A mis directores de tesis, Fede, gracias por toda la confianza que depositaste en mí, por tu apoyo y confianza, por darme la libertad de buscar los temas en los que trabajar y apoyar mis ideas a la vez que me centrabas y ayudabas a poder bajar esas ideas a la poyata. Gracias por inculcarnos la idea de que la ciencia va a la par que las personas, es un placer trabajar en tu laboratorio. Siempre intentando generar unión entre todos. Cati, se puede decir que eres más que una directora, eres también una compañera. De ti he aprendido como hay que afrontar cualquier situación, por dura que sea, que nunca puede faltar una sonrisa y nunca perder la positividad. Es increíble la fortaleza que posees. Gracias por darme la oportunidad junto con Fede de asistir a un gran número de congresos y animarme a participar. Gracias por guiarme durante este viaje y siempre



estar disponible cuando más me hacía falta. Yo siempre he sido positivo, pero creo que gracias a ti he aprendido aún más a serlo y a valorar lo importante que es transmitírselo a los demás.

Al laboratorio 320, gracias por acogerme y llegarse a convertir en mi segunda residencia durante los últimos 5 años. Sofi, gracias por ser mi mentora, gracias por ser siempre sincera conmigo y enseñarme lo que hacer, aunque demasiadas veces yo fuese más hermético que un *tupper*. Gracias por estar siempre pendiente de mí y enseñarme cómo manejar las diferentes situaciones dentro del laboratorio. Sabes que todavía nos queda mucho que compartir fuera de las paredes del CBM. Guzmán, aquí tengo que reconocer que tu fuiste mi primer mentor dentro del laboratorio cuando llegue para hacer mi trabajo de fin de grado, gracias por ser un referente para mí y mostrarme que fuera de la academia existe otro mundo también. Paula gracias por toda tu ayuda y tu experiencia que hacían que cualquier experimento fuese posible. Alba Ortega, como hay dos Albas y tú eres la nueva, te tocó por el apellido, gracias por tu ayuda incansable en mi proyecto y por tu ayuda con las células y los ratones, gracias a tu ayuda pude dar un sprint final al proyecto. Ana, aunque tu paso fue cortito por el 320, puedo decir que tu buen rollo se contagiaba de una manera increíble y gracias a todo tu trabajo y experiencia con los animales pude hacer muchos experimentos que por mi cuenta hubiese sido imposible. Alba y Maria, mis compañeras de tesis, no podía tener mejores personas. Alba, eres la velocidad hecha persona, gracias por tu naturalidad y sinceridad, por tus esfuerzos porque siempre de intentar juntarnos a todos y por tus ganas de ayudar siempre. Maria, mi persona en el laboratorio, la verdad es que contigo he podido compartir muchas de mis alegrías, mis penas y preocupaciones porque siempre estabas ahí cuando lo necesitaba, gracias por todos los viajes improvisados, porque siempre estabas ahí para tomar un café o merendar y porque sin ti estos 4 años no hubiesen sido lo mismo. Angela, una chica incansable, gracias por estar siempre dispuesta a todo y preocuparte de mantener los lazos de amistad dentro del 320, porque quién diría que eres de las pequeñas del laboratorio, aunque tienes más tablas que cualquiera. Alejandro, te cansarás de escucharlo y verlo escrito en los agradecimientos de las tesis pero eres el “predoc” más “postdoc” que jamás he conocido, el más joven en importar técnicas del extranjero. María, eres el orden hecho realidad, gracias por ser siempre la primera en ofrecerte a resolver los marrones y ayudar en lo que sea. Belén, otra de las reinas del orden, gracias por ordenar nuestro caos. Vero, gracias por enseñarnos que existen gaditanos especiales. No puedo olvidarme de todos los que pasasteis por el “labo” y nos dejasteis experiencias increíbles. Martiña, la alegría y la bondad hechas persona,

gracias por todos los momentos que pudimos compartir tanto dentro como fuera del laboratorio, cualquier momento contigo se convierte en una fiesta y no faltan las risas. Julia, la espontaneidad, gracias por tararear conmigo el villancico que los dos sabemos muy bien en cualquier fecha del año. Clara y Elisa gracias por enseñarnos a saber ser apañado como vosotras. Gracias a AJ, Almu aunque no coincidiésemos mucho. Susana, muchas gracias por todas esas mutaciones de Gq que me ayudaste a hacer. Gracias a todos los estudiantes que han pasado por el 320 durante estos años, gracias a Marcus que consigue juntar a los nuevos y a los viejos del laboratorio.

No puedo olvidarme de agradecer a las “otras jefas” del laboratorio, por todas las ideas y discusiones de los resultados. Nila, gracias por todos tus conocimientos, eres una enciclopedia andante. Cris, gracias por saber transmitir esa pasión por la ciencia gracias a tu docencia y gracias por siempre estar activa en los seminarios. Y claro que miles de gracias a Mada por gestionar y ayudarnos a no morir en un alud de burocracia cuando intentamos avanzar en nuestro trabajo, siempre con cariño, paciencia y una sonrisa.

Gracias a la gente de otros laboratorios que nunca dudaron en ayudar a lo que necesitase durante estos años. Muchísimas gracias al 321, en especial a Araceli y Laura. Siempre que dudes en cualquier técnica o no estés seguro, Araceli e lo sabrá y estará dispuesta a ayudar. Gracias al 326, porque siempre nos acompañan en las fiestas de Navidad y primavera, aunque siempre son nuestros rivales más férreos en la Gymkanas. Siempre que necesitamos anticuerpos y reactivos siempre están ahí. En especial a Pau y Cristina. También quiero agradecer al laboratorio de Jaime Millán por su ayuda y las colaboraciones tan fructíferas que hemos tenido, en especial a Natalia y Cristina.

Creo que es importante recordar y agradecer a todos los profesores que me formaron y encendieron la chispa de la ciencia en mí. Gracias a Luis, por animarme a seguir en el camino de la Biología, por enseñarme a pensar por mi mismo y no quedarme solo en lo que ponías en las presentaciones de tus clases, por enseñarnos a amar la naturaleza y que nos diésemos cuenta de la vida que nos rodea. También gracias a Alfonso, por enseñarme que además de los seres vivos la geología es esencial para comprender la vida tal y como la conocemos. Quiero agradecer a Miguel Pita, por darme la primera oportunidad en poder conocer como era un laboratorio cuando a penas yo estaba terminando segundo de carrera y por enseñarme de verdad lo que era un laboratorio. Gracias también a Octavian por enseñarme como son los laboratorios y como se trabaja fuera de nuestras fronteras.



Aunque si alguien es responsable de cualquier logro obtenido, esos son mis padres. Gracias por todo el apoyo que me habéis dado estos años, por los ánimos, por enseñarme que una de las cosas más importantes que me dejaríais es la educación, que es lo más importante que una persona puede tener, gracias por transmitirme los valores como persona. Gracias por estar ahí en todo momento y confiar en mí. Mamá, gracias por cuidar siempre de mí y por estar orgullosa de mí, por enseñarme que ante todo hay que ser buena persona y ayudar siempre a los demás cuando lo necesiten sin necesidad de ir publicando por ahí tus acciones. Además, estos últimos años me has enseñado que luchando se supera todo. Papá, gracias por animarme siempre a que continúe aprendiendo y formándome porque sabes que es el mejor legado que me puedes dejar. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y trabajo se puede llegar donde te propongas, por enseñarme unos ideales que yo también intento transmitir a los demás. Jorge, gracias por enseñarme desde pequeño a tener responsabilidades, siento mucho orgullo en ver como desde pequeño me acompañas y sigues mis pasos, de ver como te conviertes en una versión mejorada de mí, de verdad que estoy muy orgulloso de ti de que seas mi hermano. Quiero dar las gracias a mis abuelas, por su sabiduría y por enseñarme el valor que tienen las personas mayores. Gracias güela, por quererme tanto, apoyarme y por el orgullo que sientes de tu nieto. Gracias por enseñarme a ser una buena persona ante todo y lo importante que es la humildad. Güelita, gracias por cuidarme desde pequeño cuando mis padres trabajaban y sobre todo gracias por tu apoyo económico para que pudiese estudiar fuera. Como mi familia es bastante grande creo que tengo que parar aquí con los agradecimientos uno a uno, gracias a toda mi familia por haber recorrido este camino junto a mí, por vuestro apoyo y por todos los momentos que hemos vivido juntos en familia. Y no me puedo olvidar de dar las gracias a mi nueva familia dominicana. Tampoco quiero olvidarme de los amigos de mis padres, porque Nuria y Carmen gracias por haber sido unas tías postizas. Gracias Juanita porque siempre me consideraste como si fuese un nieto tuyo.

Gracias a mis amigos, como se suele decir, la familia que eliges, por todo su apoyo y siempre estar ahí cuando se les necesita. Gracias a los de la tierruca, Edu, Flórez, Ferxo, Jandro, CP. Gracias a Edu y Flórez que con ellos ha sido con los que más he compartido en estos años, tanto en Cantabria como en Madrid, porque somos de esas personas que nos preocupamos los unos de los otros, muchas veces sin ni siquiera preguntarnos o dejando conversaciones pendientes durante días. Pero se que cualquier cosa para la que os necesite siempre estaréis ahí. No me puedo olvidar de toda la gente con la que compartí en el colegio mayor y después compartiendo piso, gracias por hacer mis




primeros días en Madrid increíbles y enseñarme de verdad lo que es esta ciudad. Gracias Inés por todo lo que compartimos juntos y sobre todo por compartir nuestra pasión por la ciencia. Gracias a todos los compañeros de Biología con los que compartí momentos increíbles, y sobre todo a Rodrigo y Briso, con los que comparto de manera más cercana y seguimos por el CBM. Gracias a los compañeros de máster, en especial a Inés, por tantas cervezas, tanta comida y por lo increíble que fue ese Mad Cool. Mil gracias a los de Abtao, Barrena una experiencia increíble haber podido vivir contigo y poder compartir tanto de comida, vinos, fiestas (ahí creo que más con Iñaki) y lo bueno es que nos quedan muchos planes por hacer. Gracias Silvia por haber dado ese toque femenino a ese piso lleno de hormonas masculinas y gracias por ser una persona de valores. Que no se me olvide Pablo por sus cafés que han sido mi gasolina durante estos últimos años.

Y por último, a ti Paola, gracias. Por estar siempre ahí, por ser la persona que más conoce de mí y ser la única que sabe interpretar cuando me pasa algo, aunque no quiera decirlo. También gracias a esa peluda Bimba que está entre mis piernas mientras escribo esto. Gracias Paola por ser mi mejor amiga, la mejor compañera de piso y sobre todo mi compañera de vida. Gracias por enseñarme a ser fuerte, nadie mejor que tú para enseñármelo. Espero que durante estos años vayamos encontrando y descubriendo el camino a seguir juntos de la mano. Muchas gracias por todo.

## ***TABLA DE CONTENIDOS***



**Tabla de contenido**

AGRADECIMIENTOS .....	13
TABLA DE CONTENIDOS .....	21
 ABSTRACT/RESUMEN .....	31
 ABREVIATURAS.....	37
 INTRODUCCIÓN .....	47
1. Señalización a través de receptores acoplados a proteínas G ...	49
2. Características funcionales y estructurales de los GPCR y su regulación.....	49
3. Proteínas G heterotriméricas .....	51
4. La familia Gαq/11 .....	51
4.1. Aspectos de la estructura de Gαq y relevancia en su señalización .....	52
4.2. Interactoma de Gαq .....	54
4.3. Efectores de la vía de activación de receptores acoplados a Gq.....	55
4.4. Reguladores de la vía de señalización de receptores acoplados a Gq .....	55
4.5 Microambientes celulares importantes en la señalización receptores acoplados a Gq.....	57
5. Funciones celulares y fisiológicas de Gαq/11 .....	58
5.1. Regulación de la función plaquetaria por Gαq/11 .....	58
5.2. Regulación de la función endotelial por Gαq/11 .....	58
6. Funciones celulares relacionadas con proteínas con dominios PB1 .....	60
6.1. Papel de las proteínas con dominios PB1 en la función de las células endoteliales .....	61

7. Papel del sistema Keap1-Nrf2 en la función endotelial.....	62
---	----

8. Papel de la autofagia en la función endotelial.....	64
--	----

OBJETIVOS .....	67
-----------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS .....	71
----------------------------	----

MATERIALES.....	73
-----------------	----

Tampones y disoluciones .....	73
-------------------------------	----

Oligonucleótidos .....	76
------------------------	----

Anticuerpos primarios .....	78
-----------------------------	----

Anticuerpos secundarios .....	79
-------------------------------	----

Plásmidos .....	80
-----------------	----

Tratamientos .....	82
--------------------	----

Reactivos .....	82
-----------------	----

Líneas celulares.....	83
-----------------------	----

MÉTODOS.....	84
--------------	----

Modelos animales utilizados .....	84
-----------------------------------	----

Ratones <i>Gαq flf; tie2-Cre ER</i> .....	85
---	----

Generación de ratones BAC <i>Gαq wild type; Gαq flf; tie2-Cre ER</i> y BAC <i>Gαq EEAA; ; Gαq flf; tie2-Cre ER</i> .....	87
--	----

Construcción de vectores específicos.....	88
---	----

Generación del rslp-Neo cassette .....	88
--	----

Generación del ADNc de <i>Gnaq</i> con la etiqueta HA .....	88
---	----

Generación de los BACs modificados .....	89
--	----

Técnicas de manipulación del ADN .....	93
--	----

Secuenciación del ADN.....	93
----------------------------	----

Mutagénesis del ADN.....	93
--------------------------	----

Cuantificación del ADN.....	94
-----------------------------	----

<i>Electroforesis en gel de agarosa del ADN</i> .....	94
Cultivo y manipulación de células de mamífero.....	94
<i>Cultivos primarios de células endoteliales de pulmón de ratón...</i>	94
Animales de experimentación utilizados .....	94
Recubrimiento de las placas de cultivo.....	94
Digestión de los pulmones con colagenasa.....	95
Selección Negativa.....	95
Selección positiva .....	95
Mantenimiento del cultivo primario.....	96
<i>Mantenimiento y subcultivo celular</i> .....	96
<i>Congelación y descongelación celular</i> .....	96
Transfección transitoria .....	97
<i>Método de fosfato de calcio</i> .....	97
<i>Método de Lipofectamina</i> .....	97
Lipofectamina 2000 .....	97
Lipofectamina LTX .....	97
<i>Método de Metafecteno</i> .....	98
Generación de líneas celulares estables.....	98
<i>Generación de las líneas celulares estables de los mutantes de Gαq en el dominio PB1</i> .....	98
<i>Generación de las líneas celulares estables de los mutantes de Gαq en la región KIR</i> .....	99
Obtención de explantes de hígado “Ex vivo” .....	99
Preparación de lisados celulares.....	100
<i>Obtención de lisados celulares</i> .....	100
<i>Determinación de la concentración de proteína</i> .....	100
<i>Ensayo de inmunoprecipitación</i> .....	100

Inmunodetección de proteínas tras electroforesis .....	101
Ensayos de función e integridad vascular “in vivo” .....	102
<i>Ensayo de sangrado en cola</i> .....	102
<i>Miles assay</i> .....	103
<i>Ensayo de permeabilidad vascular inducida por LPS</i> .....	104
Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes .	105
<i>Inmunofluorescencia</i> .....	105
<i>Adquisición de imágenes</i> .....	106
<i>Cuantificación de imágenes</i> .....	106
Citometría de flujo .....	106
<i>Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i> .....	106
Análisis estadístico .....	107

## RESULTADOS ..... 109

### 1. *Generación de los modelos de ratón HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI para investigar el papel de la interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 en la función vascular.*..... 111

#### 1.1. Construcción de vectores BAC Gnaq wt y BAC Gnaq EEAA 112

#### 1.2. Generación de los ratones transgénicos HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI..... 114

#### 1.3. Análisis de la expresión de HA-Gαq y Gαq endógena en los ratones HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI..... 116

#### 1.4. Análisis de la delección de Gαq endógeno en las células endoteliales..... 118

### 2. *Caracterización del papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la función vascular.*..... 120

#### 2.1. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la hemostasis vascular..... 121

#### 2.2. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq

en la permeabilidad vascular .....	124
2.4. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en modelos de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS	127
2.5. Otros fenotipos .....	133
2.5.1. Los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI presentan alteraciones en los patrones de fertilidad.....	133
2.5.2. Los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI presentan con frecuencia prolapsos rectales .....	135
3. Mecanismos moleculares implicados en la función de Gαq relacionados con su capacidad con interaccionar con proteínas con dominios PB1 .....	136
3.1. Gαq participa en complejos multimoleculares mTOR/Raptor/p62 relevantes en la modulación de autofagia a través de su región de interacción con dominios PB1 .....	137
3.2. Gαq/11 es capaz de modular el complejo mTORC1 en un sistema “ex vivo” .....	140
4. Papel de Gαq en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo	142
4.1. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes en la regulación de especies reactivas de oxígeno .....	142
4.2. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes para la modulación de Nrf2	144
4.3. Keap1 como posible efector de Gαq/11.....	147
4.3.1. Asociación endógena entre Gαq y Keap1 .....	147
4.3.2. La activación de Gαq favorece la asociación de Gαq con Keap1	149
4.3.3. La asociación Gαq/Keap1 se inhibe en presencia de GRK2	150
4.3.4. La asociación entre Gαq y Keap1 es independiente de la región clásica de unión de efectores de Gαq .....	150



4.3.5. Papel de la región interacción con dominios PB1 de $G\alpha_q$ en la asociación $G\alpha_q/Keap1$ .....	151
--	-----

4.3.6. Identificación de un pseudo-motivo KIR en la región de unión de efectores de $G\alpha_q$ .....	152
---	-----

 DISCUSIÓN .....	155
---	-----

<i>La región de interacción con dominios PB1 de <math>G\alpha_q</math> afecta a la modulación de la hemostasis.....</i>	<i>157</i>
---	------------

<i>La región de interacción con dominios PB1 de <math>G\alpha_q</math> en el control de la permeabilidad del endotelio .....</i>	<i>160</i>
--	------------

<i>Implicaciones funcionales de la región de interacción con dominios PB1 de <math>G\alpha_q</math> en modelos de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS.....</i>	<i>162</i>
--	------------

<i>Otros fenotipos relacionados con la falta de interacción de <math>G\alpha_q</math> con proteínas que presentan dominios PB1.....</i>	<i>166</i>
---	------------

<i>Mecanismos moleculares implicados en la modulación de la vía de señalización mTORC1/autofagia a través de <math>G\alpha_q/11</math>.....</i>	<i>167</i>
---	------------

<i>Mecanismos moleculares implicados en la modulación de la respuesta antioxidante de Nrf2 a través de <math>G\alpha_q</math> .....</i>	<i>169</i>
---	------------

<i>Posibles implicaciones fisiopatológicas del nuevo interactoma de <math>G\alpha_q</math>.....</i>	<i>172</i>
---	------------

 CONCLUSIONES .....	175
--	-----

 BIBLIOGRAFÍA .....	179
--	-----

 APÉNDICE.....	201
---	-----

*ABSTRACT/RESUMEN*

G-protein-coupled receptor (GPCR) -mediated signaling integrates specific interactions between activated G proteins and numerous cellular effectors. Many GPCRs are coupled to Gαq proteins, which exhibit an interactive complex with signaling proteins. In addition to the region involved in the interaction with canonical effectors such as PLCβ, our group has described that Gαq has a region (called “PB1-like”) capable of interacting with proteins that have PB1 domains such as PKCζ and p62, which act as new effectors. The mutation of specific residues in that region of Gαq (Gαq-E234A / E245A, called Gαq-EEAA mutant), markedly decreases their ability to interact with these proteins.

In order to explore the role of the interactome dependent on the region of interaction of Gαq with proteins with PB1 domains in physiological contexts, in this doctoral thesis we have generated “knock-in” mice that express either the functionally intact HA-Gαq protein ( Gαq wt KI mice) or the mutant HA-Gαq-EEAA deficient in the interaction with PB1 domains (Gαq-PB1 mut KI mice), and compared various vascular phenotypes compared to animals with conditioned deletion of Gαq in endothelium (EC-Gαq KO ). Our data show that Gαq-PB1 mut KI animals show altered hemostasis in response to vascular damage, with increased bleeding patterns. On the other hand, the region of interaction with PB1 domains of Gαq is essential for endothelial function. The Gαq-PB1 mut KI animals showed a notable reduction in vascular permeability stimulated by GPCRs coupled to Gαq / 11. Furthermore, the animals without Gαq in endothelial cells (EC-Gαq KO) and the Gαq-PB1 mut KI mice showed a reduction in vascular permeability and acute lung damage induced by pro-inflammatory stimuli. Finally, the expression of HA-Gαq-EEAA causes fertility problems and the appearance of rectal prolapse in mice.

In addition, this thesis has delved into the role of Gαq in the formation of multimolecular Gαq/p62/mTOR/Raptor complexes. Under optimal nutrient conditions, the interaction between Gαq and p62 is favored, through their respective PB1 domains, thus contributing to the activation of mTORC1 and the preservation of low levels of homeostatic autophagy.

On the other hand, our results allow to propose Gαq as a relevant regulator of the production of reactive oxygen species (ROS) and of the antioxidant response orchestrated by the Nrf2 pathway. The absence of Gαq/11 in mouse embryonic fibroblasts or the stable knock-in expression of the PB1 domain interaction mutant increases ROS levels and an exacerbated response of the Nrf2 pathway. Finally, we have identified the Keap1 protein, an important modulator of Nrf2, as part of the new Gαq interactome, in a process that involves both the domain of interaction with proteins with PB1 domains and a new region homologous to the KIR motif present in p62.

In sum, our results open the door to exploring the role of Gαq in the modulation of antioxidant responses mediated by Nrf2, as well as the inhibition of Gαq and / or its interaction with proteins with PB1 domains as a therapeutic strategy in contexts of endothelial dysfunction.

La señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) integra interacciones específicas entre proteínas G activadas y numerosos efectores celulares. Numerosos GPCR están acoplados a proteínas Gαq, que presenta un complejo interactoma con proteínas señalizadoras. Además de la región implicada en la interacción con efectores canónicos como PLCβ, nuestro grupo ha descrito que Gαq presenta una región (denominada “PB1-like”) capaz de interactuar con proteínas que presentan dominios PB1 tales como PKCζ y p62, que actúan como nuevos efectores. La mutación de residuos específicos en esa región de Gαq (Gαq-E234A/E245A, denominado mutante Gαq-EEAA), disminuye marcadamente su capacidad de interactuar con estas proteínas.

Con el fin de explorar el papel del interactoma dependiente de la región de interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 en contextos fisiológicos, en esta tesis doctoral hemos generado ratones “knock-in” que expresan o bien la proteína HA-Gαq funcionalmente íntegra (ratones Gαq wt KI) o el mutante HA-Gαq-EEAA deficiente en la interacción con dominios PB1 (ratones Gαq-PB1 mut KI), y comparado diversos fenotipos vasculares en comparación con animales con delección condicionada de Gαq en endotelio (EC-Gαq KO). Nuestros datos muestran que los animales Gαq-PB1 mut KI presentan una hemostasia alterada en respuesta al daño vascular, con unos patrones de sangrado aumentados. Por otra parte, la región de interacción con dominios PB1 de Gαq es esencial para la función endotelial. Los animales Gαq-PB1 mut KI muestran una notable reducción de la permeabilidad vascular estimulada por GPCRs acoplados a Gαq/11. Además, los animales sin Gαq en células endoteliales (EC-Gαq KO) y los ratones Gαq-PB1 mut KI presentan una reducción en la permeabilidad vascular y daño agudo pulmonar inducido por estímulos proinflamatorios. Finalmente, la expresión de HA-Gαq-EEAA provoca en los ratones problemas de fertilidad y la aparición de prolapsos rectales.

Además, en esta tesis se ha profundizado en el papel de Gαq en la formación de complejos multimoleculares Gαq/p62/mTOR/Raptor. En condiciones óptimas de nutrientes se favorece la interacción entre Gαq y p62, mediante sus respectivos dominios PB1, contribuyendo así a la activación de mTORC1 y a la preservación de niveles bajos de autofagia homeostática.

Por otro lado, nuestros resultados permiten proponer a Gαq como un regulador relevante de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la respuesta antioxidante orquestada por la vía Nrf2. La ausencia de Gαq/11 en fibroblastos embrionarios de ratón o la expresión knock-in de manera estable del mutante de interacción con dominios PB1 incrementa los niveles de ROS y una respuesta exacerbada de la vía Nrf2. Finalmente, hemos identificado a la proteína Keap1, importante modulador de Nrf2, como parte del nuevo interactoma de Gαq, en un proceso que implica tanto el dominio de interacción con proteínas con dominios PB1 como de una nueva región homóloga al motivo KIR presente en p62.

En resumen, nuestros resultados abren la puerta a explorar el papel de Gαq en la modulación de las respuestas antioxidantes mediadas por Nrf2, así como la inhibición de Gαq y/o de su interacción con proteínas con dominios PB1 como estrategia terapéutica en contextos de disfunción endotelial.

## *ABREVIATURAS*





**5'UTR:** región no traducida 5', del inglés "5' Untranslated Region"

**7TMR:** Receptor de 7 dominios transmembrana, del inglés "7 Transmembrane Receptor"

**A:** Alanina

**aa:** Aminoácidos

**AC:** Adenilato ciclasa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ADP:** Adenosina difosfato

**AKT:** Proteína quinasa B

**AL:** Autolisosoma

**AMP:** Adenosina monofosfato

**AMPK:** Proteína quinasa activado por AMP, del inglés "AMP-activated protein kinase"

**AngII:** Angiotensina II

**APG:** Autofagosoma, del inglés "Autophagosome"

**AR:** Receptor adrenérgico, del inglés "Adrenergic Receptor"

**ARE:** Elementos de respuesta antioxidante, del inglés "Antioxidant response element"

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**AT1R:** Receptor de angiotensina 1, del inglés "Angiotensin receptor 1"

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BafA1:** Bafilomicina A1

**BSA:** Albumina del suero bobino, del inglés "Bovine serum albumin"

**BTK:** Tirosina quinasa de Bruto, del inglés "Bruton tyrosine kinase"

**AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico

**C:** Cisteína

**CHO:** Ovario de hámster chino, del inglés “Chinese hamster ovary”

**CMA:** Autofagia mediada por chaperonas, del inglés “Chaperone-mediated autophagy”

**C-ter:** Carboxilo terminal

**Cul3:** Ubiquitina ligasa E3 dependiente de Cullin

**DAG:** Diacilglicerol

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol, del inglés “4',6-Diamidino-2-phenylindole”

**dH2O:** Agua destilada

**DMEM:** del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**DTT:** Ditioneitol

**E:** Ácido glutámico

**EBP50:** Factor regulador del intercambiador sodio/potasio, del inglés “ERM Binding Protein 50”

**EBSS:** del inglés “Earl’s Balance Salt Solution”

**EE:** Etiqueta proteica con dos ácidos glutámicos

**ER:** Receptor de estrógenos, del inglés “Estrogen receptor”

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés “Ethylenediaminetetraacetic Acid”

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés “Epidermal Growth Factor Receptor”

**EGTA:** Ácido etilenglicol tetra acético, del inglés “Ethylene glycol tetraacetic acid”

**eMI:** Microautofagia endosomal, del inglés “Endosomal microautophagy”

**EC:** Célula endotelial, del inglés “endotelial cell”

**ECGS:** Suplemento de crecimiento de células endoteliales, del inglés “Endothelial cell grow supplement”

**eNOS:** Sintetasa de óxido nítrico endotelial, del inglés “endothelial nitric oxide synthase”

**ERK:** Quinasa reguladora por señales extracelulares, del inglés “Extracellular signal-regulated kinases”

**FBS:** Suero fetal bovino, del inglés “fetal bovine serum”

**G:** Glicina

**GABA<sub>B</sub>:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico, del inglés “ $\gamma$ -aminobutyric acid B”

**GAP:** Proteína activadora de GTPasas, del inglés “GTPase activating protein”

**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, del inglés “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”

**GDP:** Guanosina difosfato, del inglés “Guanosine Diphosphate”

**GEF:** Factor intercambiador de nucleótido de guanine, del inglés “Guanine nucleotide exchange factor”

**GFP:** Proteína verde fluorescente, del inglés “Green Fluorescent Protein”

**GLUT4:** Transportador de glucose 4, del inglés “Glucose transporter 4”

**GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G, del inglés “G protein-coupled Receptor”

**GRK:** Quinasas de receptores acoplados a proteínas G, del inglés “G protein-coupled Receptor Kinase”

**GTP:** Guanosina trifosfato, del inglés “Guanosine Triphosphate”

**HA:** Hemaglutinina (etiqueta)

**HEK 293:** Células de riñón humano 293, del inglés “Human Embryonic Kidney 293 cells”

**HEPES:** del inglés “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”

**HO-1:** Hemo oxigenasa 1

**HPAECs:** Células endoteliales de las arterias pulmonares, del inglés “Human pulmonary

artery endothelial cells”

**HPMVECs:** Células endoteliales microvasculares pulmonares humanas, del inglés “Human pulmonary microvascular endothelial cells”

**HRP:** Peroxidasa de rábano, del inglés “Horseradish peroxidase”

**Hsc70:** Proteína de choque térmico de 70kDa, del inglés “Heat shock 70 kDa protein”

**HUVECs:** Células endoteliales de la vena del cordón umbilical, del inglés “Human umbilical vein endothelial cells”

**IF:** Inmunofluorescencia

**IKK:** Inhibidor de la quinasa Kappa B, del inglés “Inhibitor of Kappa B Kinase”

**IL-6:** Interleuquina 6

**IP:** Inmunoprecipitación

**IP3:** Inositol 1,4,5 trifosfato, del inglés “Inositol 1,4,5 triphosphate”

**JNK:** Quinasa c-Jun N-terminal, del inglés “c-Jun N-terminal Kinase”

**Keap1:** proteína asociada a ECH tipo Kelch 1, del inglés “Kelch-like ECH-associated protein 1”

**KI:** del inglés “Knock-in”

**KIR:** Región de interacción con Keap1, del inglés “Keap1-Interacting Region”

**KO:** del inglés “Knockout”

**L:** Leucina

**LAMP2A:** Proteína de membrana lisosomal de tipo 2A, del inglés “Lysosomal-associated membrane protein 2 type A”

**LB:** del inglés “Luria-Bertani broth”

**LC3:** Proteína asociada a los microtúbulos 1A / 1B La cadena ligera 3B, del inglés “Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3”

**LIR:** Región de interacción con LC3, del inglés “LC3-interacting región”

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés “Mitogen-activated Protein Kinase”

**MEFs:** Fibroblastos embrionarios de ratón, del inglés “Mouse Embryonic Fibroblasts”

**MEF2:** Factor potenciador de miocitos, del inglés “Myocyte enhancer factor”

**MEK:** del inglés “MAPK and extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase”

**MEKK:** del inglés “MAP kinase kinase and extracellular signal-regulated kinase (ERK)” kinase

**MEM:** del inglés “Modified Eagle Medium”

**MLCK:** Quinasa de la cadena de la miosina ligera, del inglés “Myosin light chain kinase”

**MLCP:** Fosfatasa de la cadena de la miosina ligera, del inglés “Myosin light chain phosphatase”

**mTORC1:** Diana de mamífero del complejo 1 de rapamicina, del inglés “Mammalian target of Rapamycin Complex 1”

**mut:** Mutante

**M3:** Receptor muscarínico 3

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida, del inglés “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced”

**NF-κB:** Factor nuclear κB, del inglés “Nuclear Factor κB”

**NO:** Óxido nítrico, del inglés “Nitric oxide”

**NOX:** NADPH oxidasa

**NP40:** Nonidet P-40

**Nqo1:** NADPH quinona oxidoreductasa 1

**Nrf2:** Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2, del inglés “Nuclear factor erythroid 2-related factor 2”

**N-term:** Amino terminal

**OPCA:** motivo OPR/PC/AID

**p:** p valor

**P:** Prolina

**PAF:** Factor activador de plaquetas, del inglés “Platelets activating factor”

**PAR:** Receptor activado por proteasas, del inglés “Protease-activated receptor”

**PAGE:** Electroforesis por gel de poliacrilamida, del inglés “Polyacrilamide gel electrophoresis”

**PBS:** Tampón de fosfato, del inglés “Phosphate Buffered Saline”

**PB1:** del inglés “Phox/Bem1”

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, en inglés “Polymerase Chain Reaction”

**PDGFR:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés “Platelet-derived growth factor receptor”

**PH domain:** del inglés “Pleckstrin Homology domain”

**PI3K:** Fosfatidil-inositol quinasa 3, del inglés “Phosphoinositide 3-kinase”

**PIP2:** Fosfatidil-inositol (4,5)-bifosfato, del inglés “Phosphatidylinositol (4,5)-trisphosphate”

**PIP3:** Fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato, del inglés “Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate”

**PKA:** Proteína quinasa A, del inglés “Protein Kinase A”

**PKC $\lambda$ :** Proteína quinasa C lambda, del inglés “Protein Kinase C lambda”

**PKC $\zeta$ :** Proteína quinasa C zeta, del inglés “Protein Kinase C zeta”

**PLC:** Fosfolipasa C, del inglés “Phospholipase C”

**PMSF:** phenylmethylsulfonyl fluoride

**PMT:** Toxina de *Pasteurella multocida*, del inglés “*Pasteurella multocida* toxin”

**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, del inglés “Phosphatidylinositol



(3,4,5)-trisphosphate 3-phosphatase”

**PTX:** Toxina Pertussis, del inglés “Pertussis toxin”

**PVDF:** del inglés “Polyvinylidene fluoride”

**Q:** Glutamina

**Rbx1:** del inglés “RING-box protein 1”

**RGS:** Regulador de la señalización de proteínas G, del inglés “Regulator of G protein Signaling”

**Dominio RH:** Dominio homólogo del regulador de la señalización de proteínas G, del inglés “Regulator of G protein signalling Homology domain”

**Ric-8A:** Resistencia a los inhibidores de la colinesterasa-8A

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno, del inglés “Reactive oxygen species”

**ROCK:** Proteína quinasa asociada a Rho, del inglés “Rho-associated protein kinase”

**rpm:** revoluciones por minuto

**RTK:** Receptor tirosina quinasa, del inglés “Receptor Tyrosine Kinase”

**SARS-CoV-2:** Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, del inglés “Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2”

**SEM:** Error estándar de la media, del inglés “Standard error of the mean”

**SD:** Desviación estándar, del inglés “Standard deviation”

**SDS:** Dodecilsulfato sódico, del inglés “Sodium dodecyl sulfate”

**Ser:** Serina

**SQMST1:** del inglés “Sequestosome 1”

**STI:** Inhibidor de la tripsina de la soja, del inglés “Soybean trypsin inhibitor”

**t:** Tiempo

**T:** Treonina

**TAE:** Tris base, ácido acético y EDTA

**tBHQ:** Terbutilhidroquinona

**TE:** Tris-EDTA

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina

**TFs:** Factores de transcripción, del inglés "Transcription Factors"

**Thr:** Treonina

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , del inglés "Tumor necrosis factor  $\alpha$ "

**t-PA:** Activador tisular del plasminógeno, del inglés "Tissue plasminogen activator"

**TRPM8:** Miembro 8 de la subfamilia M del canal catiónico potencial del receptor transitorio, del inglés "Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8"

**Tyr:** Tirosina

**Ub:** Ubiquitina

**VE:** del inglés "Vascular endothelial"

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés "Vascular endotelial growth factor"

**vWF:** Factor de *von Willebrand*

**WB:** Inmunoblot, del inglés "Western Blot"

**WDR36:** La proteína 36 que contiene la repetición WD, del inglés "WD repeat-containing protein 36"

**WT:** Wild type

## *INTRODUCCIÓN*

## 1. Señalización a través de receptores acoplados a proteínas G

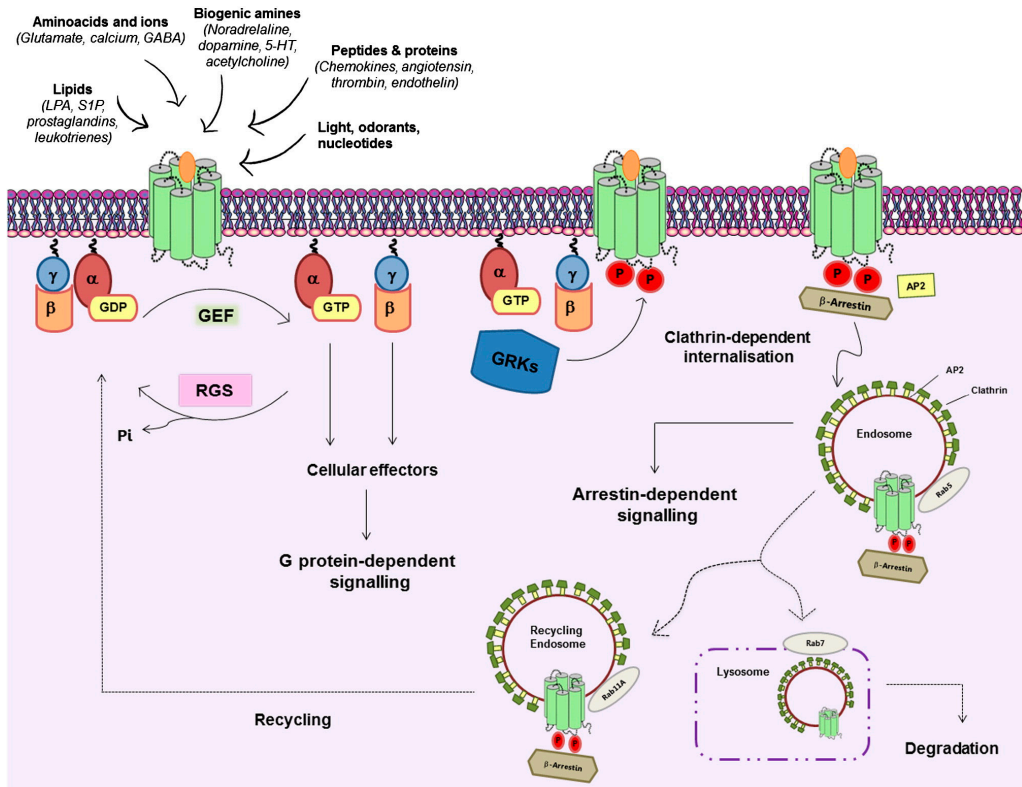
Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés “G-protein coupled receptors”), representan la familia de receptores de membrana más extensa, versátil y ubicua que se conoce (Hilger, Masureel, & Kobilka, 2018). Los GPCRs median las acciones de muchos neurotransmisores, hormonas, citoquinas y otra serie de estímulos, como es el caso de iones de calcio, moléculas odorantes, sabores amargos y dulces, e incluso fotones de la luz (Hilger et al., 2018). Existen aproximadamente 475 fármacos ( $\approx 34\%$  de los fármacos aprobados por la agencia de fármacos y alimentos (FDA) estadounidense) que actúan contra 108 dianas únicas de GPCRs (Hauser, Attwood, Rask-Andersen, Schiöth, & Gloriam, 2017). En particular, desde la perspectiva de los objetivos de esta tesis, es interesante destacar el papel tan relevante que se ha descrito para diversos GPCRs en la regulación de la homeostasis endotelial (Wettschureck & Offermanns, 2005; Korhonen et al., 2009; Mikelis et al., 2015; Sivaraj et al., 2015; Wettschureck, Strilic, & Offermanns, 2019). Un mejor conocimiento de los mecanismos de señalización involucrados en la homeostasis de los procesos endoteliales contribuirá a una mejor comprensión de la regulación de estas vías en condiciones patológicas.

## 2. Características funcionales y estructurales de los GPCR y su regulación

La superfamilia de los GPCR se agrupa en tres familias diferentes (denominadas A, B y C) en función de la homología de sus secuencias. Dentro de cada familia, comparten aproximadamente un 25% de identidad de secuencia en las regiones transmembrana, y en otro gran número de residuos y motivos conservados (Hilger et al., 2018). La familia A es el grupo más numeroso, e incluye a la rodopsina y a los receptores adrenérgicos. La familia B está compuesta por solo 25 miembros, en los que están incluidos los receptores para las hormonas gastrointestinales, con gran homología con los receptores de glucagón y secretina. La familia C es también relativamente pequeña y está compuesta por los receptores metabotrópicos del glutamato, el receptor GABA<sub>B</sub> (del inglés, “ $\gamma$ -aminobutyric acid B), los receptores sensores de calcio y un gran número de receptores del gusto (Pierce, Premont, & Lefkowitz, 2002).

Los receptores acoplados a proteínas G provocan la activación de las proteínas G intracelulares (Hepler & Gilman, 1992; Hubbard & Hepler, 2006). Los agonistas se unen a los GPCRs provocando un importante reordenamiento de las hélices intracelulares 6 y 3 (Rasmussen et al., 2011; Standfuss et al., 2011), permitiendo la activación de las subunidades G $\alpha$  gracias a la disociación del GDP y posterior unión de GTP (Fig. I1).

Esto permite la disociación de las proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha\beta\gamma$ ) en la subunidad  $G\alpha$  unida a GTP y un dímero formado por  $\beta\gamma$ , cada uno de los cuales tendrán capacidad independiente para regular a los diferentes efectores. La hidrólisis de la molécula de GTP se produce en la región de unión de nucleótidos de las subunidades  $G\alpha$ , proceso que se encuentra regulado por las proteínas reguladoras de la señal de las proteínas G (RGS, del inglés “Regulators of G-protein signaling”), que permiten la re-asociación del heterotrímero y la terminación de la señalización (Magalhaes, Dunn, & Ferguson, 2012).



**Figura II.** Ciclo de activación y desactivación de los GPCRs. Para más detalles consultar el texto principal. (Sánchez-Fernández et al., 2014).

Además, cabe destacar la existencia de otra forma de desensibilización, o terminación de la señal, de los GPCRs a través de la fosforilación de los receptores activos gracias a la acción de quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), que provocan un incremento en la afinidad de la unión entre las arrestinas y los GPCRs fosforilados. De este modo, se impide la unión de las proteínas G a los receptores fosforilados, facilitando la posterior endocitosis de los mismos, mediada por clatrina (Krupnick & Benovic, 1998). Gracias a este mecanismo los receptores son enviados a degradación o,

de manera alternativa, participan en la re-sensibilización y reciclaje hacia la membrana plasmática, en un mecanismo dependiente de numerosas proteínas GTPasa pequeñas de la superfamilia de Ras (proteínas Rab) (Fig. 11) (Sorkin & Von Zastrow, 2009). Además, las  $\beta$ -arrestinas funcionan como adaptadores multifuncionales de proteínas que se unen a los GPCR promoviendo diferentes vías de señalización independientes, y a veces espacial y temporalmente segregadas, de la señalización mediada por proteínas G (DeWire, Ahn, Lefkowitz, & Shenoy, 2007; Hilger et al., 2018).

### 3. Proteínas G heterotriméricas

A pesar de la diversidad y el tamaño de la superfamilia de los GPCR, existe un número relativamente pequeño de proteínas G encargadas de iniciar una gran cantidad de cascadas de señalización. En el caso del genoma humano, las proteínas G están codificadas por 35 genes, de los cuales, 16 pertenecen a subunidades  $\alpha$ , 5 a subunidades  $\beta$  y 14 a subunidades  $\gamma$  (Milligan & Kostenis, 2009; Syrovatkina, Alegre, Dey, & Huang, 2016). Basándose en la similitud de secuencia, las subunidades  $G\alpha$  están divididas, principalmente, en cuatro subfamilias (Gs, Gi, Gq y G12) (S Offermanns & Simon, 1998; Syrovatkina et al., 2016), y esta clasificación ha servido para definir tanto el acoplamiento del receptor como del efector. La mayoría de los GPCRs son capaces de activar a más de un subtipo de  $G\alpha$ , aunque suelen tener una preferencia por un subtipo frente a otro (Gudermann, Schöneberg, & Schultz, 1997). Además, las subunidades  $G\beta\gamma$  son también capaces de unir y activar a un gran número de proteínas celulares (Milligan & Kostenis, 2009).

### 4. La familia $G\alpha_q/11$

La familia de proteínas  $G\alpha_q/11$  está formada por cuatro miembros (Hubbard & Hepler, 2006).  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$  se expresan de manera ubicua,  $G\alpha_{14}$  se encuentra en el riñón, hígado y pulmón y  $G\alpha_{15/16}$  (ortólogos de ratón/humano, respectivamente) solo se expresan en las células hematopoyéticas. En el caso de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$ , son proteínas con una homología muy elevada (aproximadamente el 90% de identidad de aminoácidos) y en general son capaces de activar de manera indistinguible a los mismos efectores celulares (Sánchez-Fernández et al., 2014; Litosch, 2016;). Cabe destacar que existen solo dos funciones conocidas diferenciales que presenta  $G\alpha_q$  pero no  $G\alpha_{11}$ : la activación a través de la toxina de *Pasteurella multocida* (PMT) (Orth, Lang, & Aktories, 2004) y la capacidad de asociación con el canal activado por frío, TRMP8 (del inglés “Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8”) (L.

Li & Zhang, 2013). En la mayoría de los casos se asume que tienen una redundancia funcional, y en lo que respecta a las herramientas experimentales que se utilizan para su estudio, como por ejemplo el uso de anticuerpos, éstos reconocen a ambas proteínas indistintamente. Es importante destacar que solo los ratones *knockout* dobles de  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  muestran severas anormalidades cardíacas que provocan la muerte del animal en el estadio embrionario (Offermanns et al., 1998). Los ratones carentes solo de  $G\alpha_q$  sufren defectos en la hemostasis primaria y ataxia cerebelar (Offermanns, Toombs, Hu, & Simon, 1997), mientras que los ratones deficientes específicamente en  $G\alpha_{11}$  parecen ser viables y su estado es saludable (Offermanns et al., 1998). En esta tesis asumiremos que existe una amplia redundancia funcional entre  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$ , nos centraremos principalmente en  $G\alpha_q$  y solo haremos distinciones entre  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{11}$  cuando hablemos de los resultados en los ratones que son deficientes en  $G\alpha_{11}$ .

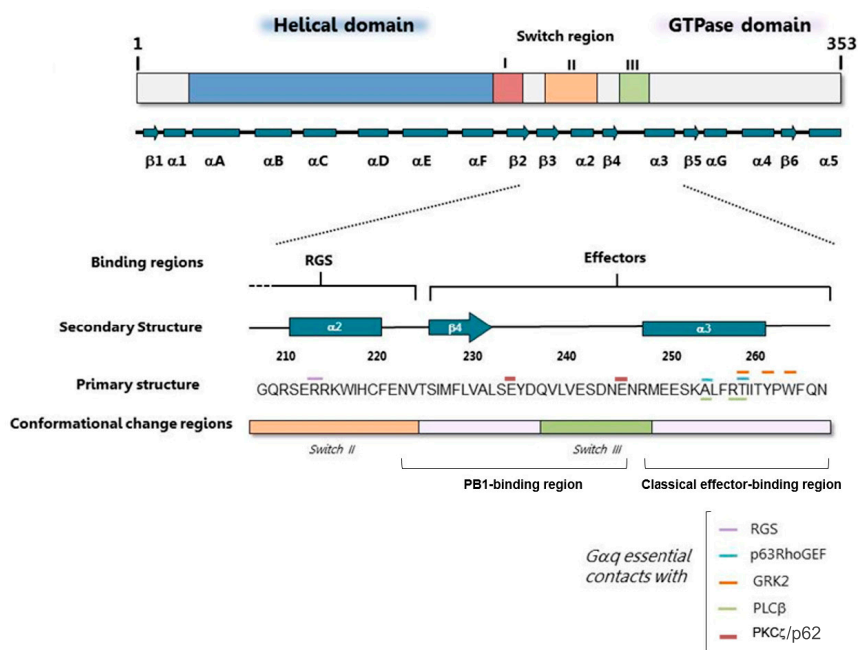
#### 4.1. Aspectos de la estructura de $G\alpha_q$ y relevancia en su señalización

La estructura de las subunidades  $G\alpha$  muestra una región de plegamiento conservada que comprende un dominio GTPasa y un dominio helicoidal (Oldham & Hamm, 2008). El dominio GTPasa es el encargado de participar en la hidrólisis de GTP a GDP, y está implicado en la unión con los GPCRs, GDP/GTP, las subunidades  $G\beta\gamma$  y los efectores. Este dominio contiene tres bucles flexibles altamente conservados (llamados *switches* I, II y III) que presentan importantes cambios conformacionales entre los estados de unión a GDP o GTP de la proteína. El dominio helicoidal forma una especie de tapa sobre el dominio de unión de nucleótidos que está involucrado en el incremento de la afinidad de las subunidades  $G\alpha$  por los nucleótidos de guanina y en el incremento intrínseco de la actividad de hidrólisis de GTP (Echeverría et al., 2000). Las regiones N-terminal y C-terminal de las subunidades  $G\alpha$  son esenciales para la especificidad con el receptor, la interacción con las subunidades  $G\beta\gamma$  y para la localización en membrana de las proteínas G. Todas las subunidades  $G\alpha$  tienen modificaciones lipídicas en la región N-terminal.  $G\alpha_q$  está palmitoilada en residuos de cisteína (C9 y C10) (Linder et al., 1993), que junto con la interacción a través de la región isoprenilada del dímero de  $G\beta\gamma$ , promueve la localización de las proteínas G en la periferia de la membrana (Wise, Carr, Groarke, & Milligan, 1997; Crouthamel, Thiyagarajan, Evanko, & Wedegaertner, 2008).

En todas las estructuras cristalizadas de los complejos de las proteínas G con sus efectores, aparece un dominio general de unión con los mismos (Sprang, Chen, & Du, 2007). La estructura de esas regiones está muy conservada a lo largo de las diferentes



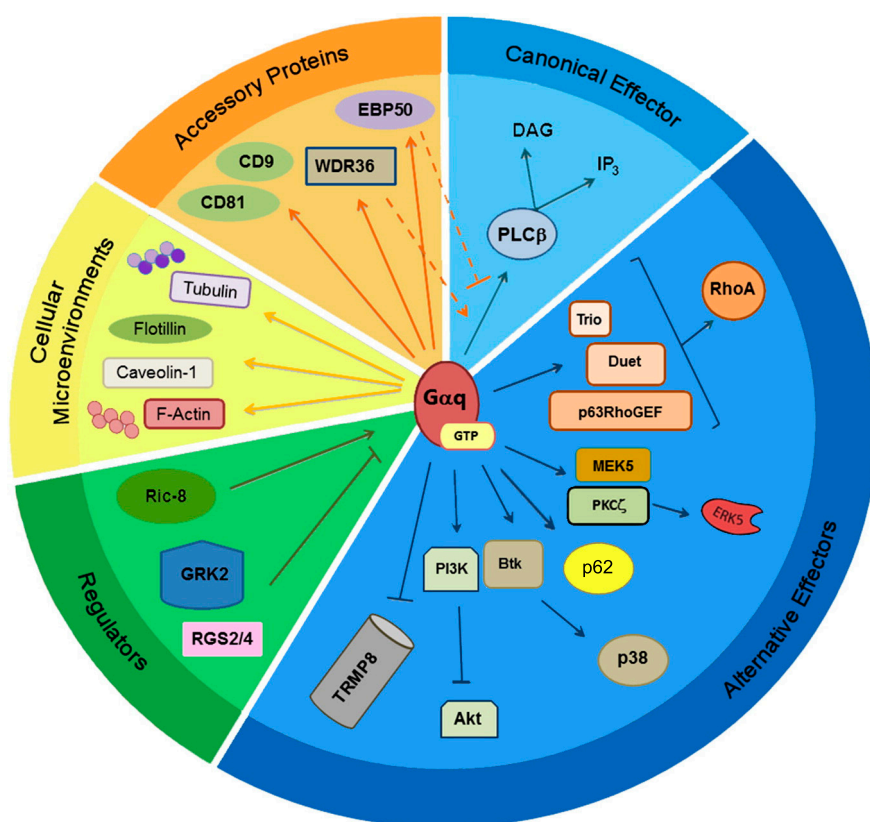
familias de  $G\alpha$ , y se asume que la especificidad con los diferentes efectores está mayoritariamente determinada por la secuencia de aminoácidos (Oldham & Hamm, 2008). Existen evidencias que muestran que los efectores se excluyen mutuamente y compiten por la interacción con la región de unión con el efector (Carman et al., 1999; Lutz et al., 2005). Están disponibles las estructuras cristalizadas de  $G\alpha_q$  formando complejos con  $PLC\beta$  (Waldo et al., 2010),  $p63RhoGEF$  (Williams et al., 2007) y  $GRK2$  (Tesmer, Kawano, Shankaranarayanan, Kozasa, & Tesmer, 2005), que aportan información sobre las superficies clásicas de unión con los efectores de  $G\alpha_q$ . Recientemente, nuestro grupo describió una nueva región ácida de unión en  $G\alpha_q$ , que difiere de la región clásica de unión de efectores, responsable de la interacción con proteína quinasa C  $\zeta$  ( $PKC\zeta$ ), en la cual aparecen dos residuos de ácido glutámico en las posiciones 234 y 245 esenciales para esta asociación (Sánchez-Fernández et al., 2016). Es interesante destacar que los residuos de  $G\alpha_q$  en las posiciones 221 a 245 muestran una homología de secuencia muy alta con los dominios PB1 de tipo I (presentes en MEK5,  $p40phox$  o en los dominios PB1 tipo I/II de proteínas como  $p62$ ), revisado en (Moscat, Diaz-Meco, Albert, & Campuzano, 2006; Sumimoto, Kamakura, & Ito, 2007). La figura I2 muestra con más detalle las regiones de interacción de  $G\alpha_q$ .



**Figura I2. Regiones estructurales y de unión de  $G\alpha_q$ .** Representación lineal de la secuencia de  $G\alpha_q$  que muestra los dominios tridimensionales, la estructura secundaria y las regiones de unión. Se muestran los contactos entre  $G\alpha_q$  y los diferentes efectores. Figura modificada de (Sánchez-Fernández et al., 2014).

## 4.2. Interactoma de Gαq

Durante los últimos años se han descrito un gran número de proteínas celulares que interaccionan con Gαq, las cuales permiten la transducción o la desactivación de la señalización mediada por esta proteína (ver esquema del interactoma de Gαq en la Figura I3). Por lo general, los efectores de Gαq son proteínas cuya actividad depende de la interacción con Gαq unido a GTP tras la activación del receptor. Por otro lado, existen interactores negativos que disminuyen la señalización de Gαq, ya sea promoviendo su actividad GTPasa o secuestrándola de sus efectores (Sánchez-Fernández et al., 2014).



**Figura I3. El interactoma de Gαq.** En el esquema se muestran la gran cantidad de interactores que posee Gαq y la diversidad de actividades en las que se encuentra implicado. Se muestran tanto los efectores canónicos como los efectores alternativos junto con los reguladores de la señalización de Gαq y las proteínas accesorias. También se encuentran descritos los interactores que determinan el microambiente celular. Figura modificada de (Sánchez-Fernández et al., 2014).

### 4.3. Efectores de la vía de activación de receptores acoplados a Gq

La familia de la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ , del inglés “phospholipase C $\beta$ ) es considerada como el efector canónico de G $\alpha$ q. G $\alpha$ q unido a GTP se une directamente a PLC $\beta$  permitiendo la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) para formar inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que son dos mensajeros secundarios celulares muy importantes que permiten la movilización intracelular de calcio y la posterior activación de diversas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) (Rhee, 2001). Por otro lado, la asociación entre G $\alpha$ q y p63RhoGEF, que está implicada en la activación de RhoA, se relaciona con el control de la organización y dinámica del citoesqueleto de actina (Williams et al., 2007). Los efectores p63RhoGEF y PLC $\beta$  son capaces de competir entre ellos y modular de manera negativa sus respuestas mutuamente (Lutz et al., 2005). A su vez, existen otros efectores alternativos como RhoGEF Trio y Duet, que son esenciales para la transducción de determinadas señales a través de GPCRs unidos a G $\alpha$ q (Vaqué et al., 2013; Williams et al., 2007). Otro de los efectores alternativos es la tirosina quinasa de Bruton (Btk), implicada en la activación de la quinasa p38 MAPK (Y. C. Ma & Huang, 1998). Además, en nuestro grupo se han descrito a PKC $\zeta$  y MEK5 como nuevos efectores de G $\alpha$ q, los cuales son responsables de la activación de las vías de señalización de ERK5 formando un complejo ternario transitorio. Esas interacciones y la consiguiente activación de ERK5 son independientes de PLC $\beta$  y promueven apoptosis en ciertos contextos (García-hoz, Díaz-meco, Moscat, & Mayor, 2010; García-hoz et al., 2012; Sánchez-Fernández et al., 2016). Como se detallará en varios apartados de esta tesis, otro efector alternativo de G $\alpha$ q descrito por nuestro grupo ha sido la proteína p62/SQSTM1, cuya asociación, a través de la interacción con dominios PB1, contribuye a la activación mTORC1 y a la consecuente inactivación de la macroautofagia (Cabezudo et al., 2020).

### 4.4. Reguladores de la vía de señalización de receptores acoplados a Gq

Existen principalmente dos grupos de reguladores de la señalización de G $\alpha$ q, las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS) o las quinasas reguladoras de los receptores acoplados a proteínas G (GRK, del inglés “G-protein coupled receptor kinase”).

Las proteínas RGS interaccionan y activan la función GTPasa de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G (GAP, del inglés “GTPase activating protein”), favoreciendo su inactivación. Dentro de los distintos miembros de proteínas RGS que se conocen, las

proteínas RGS2 y RGS4 son las que se han descrito como moduladoras de la actividad de  $G\alpha_q$ . La región de unión de las proteínas RGS2/4 en  $G\alpha_q$  se superpone con la región de interacción con  $PLC\beta$  y su regulación provoca una competición entre ambas (Shankaranarayanan et al., 2008). La proteína RGS4 es capaz de inhibir tanto la señalización de  $G\alpha_q$  como de  $G\alpha_i$ , mientras que RGS2 solo inhibe a  $G\alpha_q$  (Xu et al., 1999). Por lo tanto, RGS2/4 ejercen una regulación negativa doble sobre  $G\alpha_q$ , por una parte potenciando su actividad GTPasa y por otra, induciendo un bloqueo alostérico sobre la región de unión del efector a  $G\alpha_q$  (Shankaranarayanan et al., 2008).

Por otro lado, las quinasas GRKs, además de la función que presentan en la desensibilización de los GPCR, tienen adscritas un gran número de funciones celulares y fisiológicas independientes de su acción sobre estos receptores (Mayor et al., 2018; Murga et al., 2019; Nogués et al., 2018, 2017). Todas las isoformas de las GRKs poseen una región amino terminal denominada dominio RH (del inglés, “RGS Homology domain”), que presenta un alto grado de homología con el de las proteínas RGS (Sterne-Marr et al., 2003), a través del cual estas proteínas interactúan con la subunidad  $\alpha$  de proteínas G. En el caso de GRK2, este dominio RH es capaz de interactuar con  $G\alpha_q$  provocando una disminución de la señalización a través de efectores como  $PLC\beta$  (Carman et al., 1999) o  $PKC\zeta$  (Sánchez-Fernández et al., 2016).

Además de los reguladores principales de la señalización de  $G\alpha_q$ , existen otras proteínas accesorias encargadas de ayudar al correcto acoplamiento y/o localización de los complejos efectores de las proteínas G, contribuyendo a una señalización correcta. Así, la proteína WDR36 (del inglés “WD repeat-containing protein 36”) une al receptor de tromboxano A2 de tipo  $\beta$  ( $TP\beta$ ),  $G\alpha_q$  y  $PLC\beta$  dentro del mismo complejo activo (Cartier, Parent, Labrecque, Laroche, & Parent, 2011); las proteínas CD9 y CD81 interactúan con  $G\alpha_q$  y el receptor GPR56, facilitando el acoplamiento del receptor con la proteína G (Little, Hemler, & Stipp, 2004); mientras que la proteína EBP50 interactúa con  $G\alpha_q$  inhibiendo la señalización de  $PLC\beta$  y la internalización de  $TP\beta$  (Rochdi & Parent, 2003).

Aparte de los mecanismos clásicos de modulación de los GPCRs, existen otras formas de regulación no canónica que pueden regular el intercambio de nucleótidos de guanina y de la señalización mediada por  $G\alpha_q$ . Este es el caso de las proteínas Ric-8A y Ric-8B que pueden unirse directamente y activar a las subunidades  $G\alpha$  desasociadas (Nishimura et al., 2006; Tall, Krumins, & Gilman, 2003). Además, las proteínas Ric-8 son capaces de modificar de manera positiva la localización y la cantidad de proteínas

G (Gabay et al., 2011). Así, Ric-8A previene la ubiquitinación de  $G\alpha_q$  provocando una estabilización en los niveles de expresión de esta proteína (Chishiki, Kamakura, Yuzawa, Hayase, & Sumimoto, 2013).

#### 4.5 Microambientes celulares importantes en la señalización receptores acoplados a $G_q$

La proteína  $G\alpha_q$  es conocida por interaccionar con un gran número de componentes del citoesqueleto, con importantes organizadores de microdominios de membrana, y estar presente en diferentes orgánulos (Sánchez-Fernández et al., 2014).  $G\alpha_q$ , junto con  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_s$ , son capaces de estimular la actividad GTPasa de la tubulina promoviendo su desestabilización, mientras que las subunidades  $G\beta\gamma$  promueven su estabilidad (Dave, Saengsawang, Yu, Donati, & Rasenick, 2009). Además, la activación de GPCRs acoplados a  $G\alpha_q$  permite reclutar la tubulina a la membrana favoreciendo la activación de  $PLC\beta$ . Por otro lado,  $G\alpha_q$  interacciona con los filamentos de actina, provocando la activación de  $PLC\beta$  (Ibarrondo et al., 1995). Gracias a la cooperación entre los componentes del citoesqueleto, los GPCRs y las proteínas G, la señalización se concentra en dominios específicos de las membranas denominados balsas lipídicas, y en ocasiones se utiliza a  $G\alpha_q$  como marcador de balsas lipídicas denominadas caveolas (Qiu, Wang, Law, Chen, & Loh, 2011). De hecho, se ha descrito una interacción entre las proteínas Caveolina-1 y  $G\alpha_q$  que permite la modulación de la señal de los GPCRs acoplados a  $G\alpha_q$  aumentando su duración (Sengupta, Philip, & Scarlata, 2008; Bhattacharya et al., 2013). Además, existe una relación de  $G\alpha_q$  con las flotilinas, que son proteínas presentes en los microdominios lipídicos y en otros tipos de vesículas, que promueve la activación de p38MAPK (Sugawara et al., 2007).

En los últimos años, se ha desvelado como GPCRs que cumplen su función en la superficie celular, siguen señalizando desde endosomas tempranos, mientras están siendo enviados a degradación o reciclaje. Numerosas evidencias sugieren que las subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  se localizan también en endomembranas y orgánulos celulares como pueden ser el aparato de Golgi, retículo endoplasmático, núcleo, endosomas, mitocondrias, compartimentos autofágicos o lisosomas (Hewavitharana and Wedegaertner, 2012; Zhang et al., 2012; Benincá et al., 2014; Sánchez-Fernández et al., 2014; Cabezudo et al., 2020, en revisión).

La gran variedad de localizaciones subcelulares en las que se encuentra la proteína  $G\alpha_q$  nos sugiere la posible participación en una gran diversidad de procesos celulares.

## 5. Funciones celulares y fisiológicas de $G\alpha_q/11$

La función más establecida de  $G\alpha_q$  es la de controlar la fisiopatología cardiovascular (Yamazaki & Yazaki, 2000; Mehta & Griendling, 2007; Touyz & Berry, 2002). Existe además un amplio espectro de funciones celulares en el que  $G\alpha_q$  ejerce de mediador, como la regulación del tono del músculo liso, la activación de las plaquetas, la liberación de hormonas en la pituitaria anterior o la transmisión sináptica en la sinapsis de las células de Purkinje (Offermanns, 2006; Sánchez-Fernández et al., 2014; Babwah et al., 2015; Wetschurck et al., 2019). En esta tesis nos han interesado especialmente las funciones vasculares y endoteliales de esta proteína.

### 5.1. Regulación de la función plaquetaria por $G\alpha_q/11$

La trombina es uno de los agonistas más potentes que interviene en la activación de las plaquetas. Se genera en el lugar del daño, haciéndose imprescindible en la primera respuesta al daño vascular. Está descrito que la trombina media su respuesta a través de los receptores activados por proteasas (PAR). En concreto, PAR-1 y PAR-4 son GPCRs acoplados a  $G\alpha_q/11$  (Li, Han, Knauss, Woulfe, & Nieman, 2020) y la activación plaquetaria por trombina genera la liberación de ADP. El ADP, a su vez, activa al GPCR acoplado a  $G\alpha_q$ , P2Y<sub>1</sub>, que es el responsable de mediar los cambios morfológicos que sufren las plaquetas induciendo su agregación (Offermanns et al., 1997; Fabre et al., 1999).  $G\alpha_q$  también participa en la función plaquetaria a través de otros GPCRs. Así, se ha descrito una reducción de la agregación plaquetaria en respuesta a tromboxano A<sub>2</sub> en plaquetas deficientes en  $G\alpha_q$  (G. J. Johnson, Leis, & Dunlop, 1996). Esta delección de  $G\alpha_q$  se ve reflejada en el incremento observado de los tiempos de sangrado (Offermanns et al., 1997).

### 5.2. Regulación de la función endotelial por $G\alpha_q/11$

En la modulación de la apertura de la barrera endotelial por GPCRs intervienen mediadores inflamatorios como pueden ser la histamina, bradiquinina o trombina. Estos mediadores tienen en común que son capaces de activar a receptores acoplados a proteínas  $G\alpha_q/11$  (Wetschurck & Offermanns, 2005; Sivaraj et al., 2015). Se ha descrito que los ratones deficientes en  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  en el endotelio no presentan un incremento de la permeabilidad endotelial tras el tratamiento con el factor activador de plaquetas (PAF), histamina o el péptido activador del receptor activado por proteasas 1 (PAR1), y además esos ratones están protegidos de la anafilaxis (Korhonen et al.,

2009). Aunque el mecanismo exacto por el que  $G\alpha_q/11$  media la apertura de la barrera no está claramente establecido, existen algunas evidencias que indican que la histamina promueve la contracción de la actomiosina a través de la activación de la vía de señalización  $G\alpha_q/11$ /Trio/RhoA. Esto permitiría la relocalización de los complejos de adhesión de VE-cadherina a las uniones focales adherentes, provocando huecos en la barrera endotelial que generaran fugas en el endotelio (Mikelis et al., 2015). Además, la trombina también incrementa la permeabilidad de la barrera endotelial mediada por la reducción de la actividad de Rac1 (Birukova, Zagranichnaya, Alekseeva, Bokoch, & Birukov, 2008). Tanto histamina como bradiquina incrementan la fosforilación de la VE-cadherina en su residuo de tirosina 685 promoviendo un incremento de la permeabilidad vascular (Orsenigo et al., 2012).

También existen evidencias de que vías de señalización inducidas por GPCRs asociados a  $G\alpha_q/11$  son críticas para la permeabilidad vascular inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que se reduce fuertemente en células sin  $G\alpha_q/11$  en endotelio (Sivaraj et al., 2015), aunque se desconoce el mecanismo implicado.

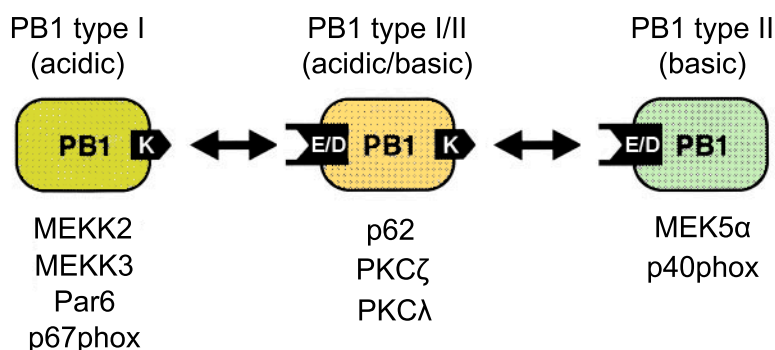
En situaciones de sepsis, se produce una disfunción de la microvasculatura, induciéndose una activación del endotelio y una posterior disfunción endotelial. Esta respuesta endotelial a los mediadores inflamatorios provoca una serie de cambios en las células endoteliales, como son el *swelling* del citoplasma y despegamiento, y expresión de moléculas de adhesión, provocando un incremento de la adhesión de plaquetas y el tráfico endotelial (Schouten, Wiersinga, Levi, & van der Poll, 2008). Una de las características más importantes de la disfunción endotelial en sepsis y daño agudo pulmonar (ALI) es el incremento de la permeabilidad vascular, que provoca una redistribución de los fluidos y edema. Además, en sepsis el endotelio se asemeja a las características de un fenotipo protrombótico (Alberelli & De Candia, 2014). Como hemos comentado anteriormente, los receptores activados por proteasas (PARs) median los efectos celulares de algunas proteasas del sistema de coagulación, como la trombina. Estos receptores aparecen expresados en el sistema vascular tanto en plaquetas como en células endoteliales y en células del músculo liso vascular (VSMCs, del inglés “Vascular smooth muscle cells”) (Coughlin, 2005). La activación de PAR-1 provoca la liberación de una serie de factores de coagulación derivados del endotelio y factores fibrinolíticos, como pueden ser el activador del plasminógeno endotelial (t-PA), que provoca un incremento de la producción de NO (Gumundsdottir et al., 2008), o el factor *von*



Willebrand (vWF) (Cleator, Zhu, Vaughan, & Hamm, 2006). Además de participar en el incremento de la permeabilidad vascular y la formación de edema mediado por procesos de sepsis, PAR-1 participa en la respuesta pro-inflamatoria, pro-apoptótica y la disrupción de la barrera endotelial mediada por trombina en las células endoteliales (Posma et al., 2019).

## 6. Funciones celulares relacionadas con proteínas con dominios PB1

Las proteínas que contienen dominios PB1 juegan un papel clave en diferentes procesos celulares como la angiogénesis (J. Yang et al., 2000), el desarrollo cardiovascular temprano (J. Yang et al., 2000), la homeostasis de las células endoteliales (Burke & Berk, 2015), la osteoclastogénesis (Durán et al., 2004) o la polaridad celular (Hirano et al., 2005).



**Figura I4. Dominios PB1.** El dominio PB1 es un módulo de interacción proteína-proteína conservado en animales, hongos, amebas y plantas. Las proteínas se pueden clasificar en 3 tipos: proteínas con PB1 tipo I están definidos por un motivo ácido (OPCA, del inglés, “OPR/PC/AID motif”), con PB1-tipo II con un motivo predominantemente básico invariablemente gobernado por una lisina y las que presentan ambos tipos PB1 I/II. Las proteínas establecen interacciones electrostáticas entre los residuos básicos tipo II y los residuos ácidos tipo I. Estos dominios están presentes en al menos 13 proteínas, entre las que se encuentran Par6, p62, PKCζ, PKCλ, subunidades oxidasa NADPH (p40 y p67phox), activadas por mitógeno quinasas (MEKK2, MEKK3 y MEK5) o la proteína NBR1. Estos dominios proporcionan especificidad a las quinasas que los poseen garantizando la transmisión efectiva de señales celulares. Además, datos recientes sugieren que los dominios PB1 pueden servir para orquestrar cascadas de señalización que no involucren necesariamente proteínas con dominios PB1, tales como las interacciones MEK5-ERK5 y p62-ERK1. Las proteínas que contienen dominios PB1 juegan un papel fundamental en procesos celulares como osteoclastogénesis, angiogénesis y desarrollo cardiovascular temprano, polaridad celular o autofagia (Moscato et al., 2006).

El dominio PB1 es un módulo de interacción proteína-proteína que puede ser clasificado en tres tipos (ver esquema Fig.I5) (Moscato et al., 2006). Entre las proteínas



que contienen dominios PB1 se incluyen subunidades de la NADPH oxidasa (p67phox y p40 phox), módulos de señalización de proteínas quinasa C atípicas (PKC $\zeta$ , PKC $\lambda$ ), Par6, p62, quinasas activadas por mitógenos (MEK5 y todas las quinasas que señalizan anteriormente a MEKK2), o la proteína NBR1 (Moscato et al., 2006). Nuestro laboratorio ha descrito una nueva interacción con G $\alpha$ q de dos proteínas que poseen dominios PB1, como son PKC $\zeta$  y p62 (Sánchez-Fernández et al., 2016; Cabezudo et al., 2020, en revisión).

### **6.1. Papel de las proteínas con dominios PB1 en la función de las células endoteliales**

Las proteínas que contienen dominios PB1 juegan un papel esencial en el correcto funcionamiento de las células endoteliales, y cualquier desregulación de estos componentes implica la disfunción de las vías implicadas en su regulación.

En los últimos años han ido apareciendo estudios que demuestran que las proteínas que contienen dominios PB1 están altamente representadas en condiciones de estrés de flujo de los vasos sanguíneos, y tienen una función relevante en la homeostasis endotelial. En concreto, la proteína p67phox es una subunidad citosólica reguladora de la NADPH oxidasa (Nox) que posee un dominio PB1 de tipo II y, que está implicada en la regulación de la producción de ROS y en el correcto funcionamiento endotelial (Brandes et al., 2014). La activación de la GTPasa Rac1 tras estrés de flujo (Brandes et al., 2014) permite la interacción de p67phox con Tiam-1 (otra Rac GEF) que induce la formación de complejos de polaridad celular y la generación de ROS en las células endoteliales (Ikeda et al., 2005). Otro aspecto interesante a destacar es la relación que existe con VE-Cadherina, que sugiere que las uniones célula-célula están asociadas con la señalización a través de ROS y la polaridad celular, como se sugiere para la migración de las células endoteliales (Conway et al., 2013).

Otra de las proteínas que está altamente relacionada con la regulación del correcto funcionamiento de las células endoteliales y que presenta estos dominios es la PKC atípica, PKC $\zeta$ . La activación de PKC $\zeta$  provoca un incremento de la permeabilidad vascular (J. H. Kim et al., 2014), producción de ROS (Wilson, Gill, Perisic, Quinn, & Williams, 2003), inflamación (Duran, Diaz-Meco, & Moscat, 2003; Nigro et al., 2010; Kim, Nigro, Fujiwara, Abe, & Berk, 2012) y apoptosis (Duran et al., 2003; Kim et al., 2012), contribuyendo a la disfuncionalidad de las células endoteliales. Además, existe una relación muy estrecha entre las proteínas PKC $\zeta$  y p62, debido a que PKC $\zeta$  es capaz

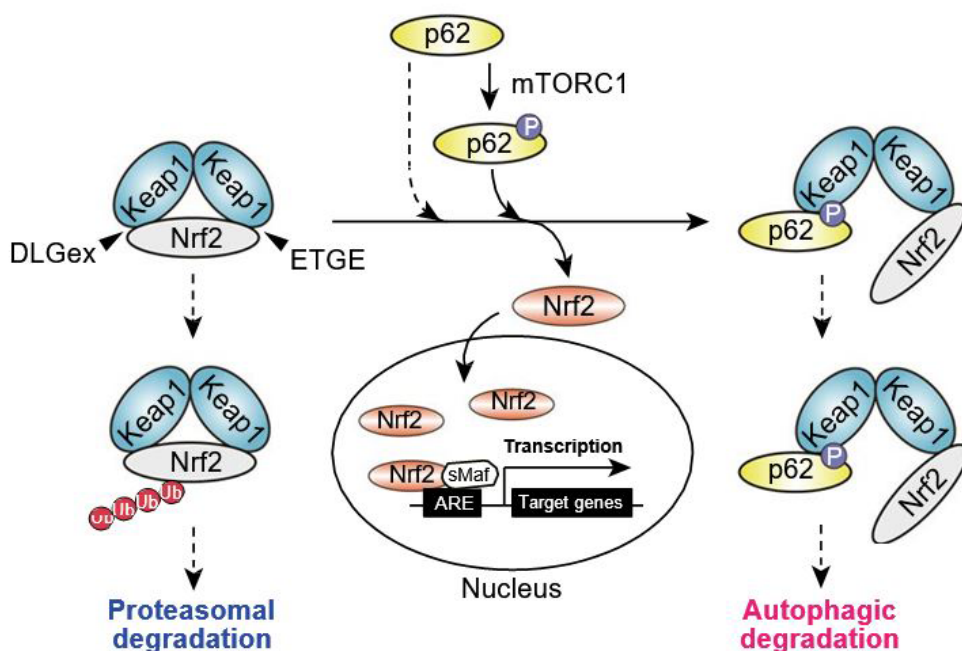
de disociar los homodímeros de p62, provocando una disrupción del funcionamiento normal de p62 (Ren, Wang, Wang, & Wu, 2014).

Entre las proteínas que presentan dominios PB1, cabe destacar a la proteína p62, ya que es un nexo de unión entre los mecanismos de autofagia, estrés oxidativo e inflamación. p62 induce una serie de cambios en las vías de señalización y en la localización subcelular de proteínas que son cruciales para la homeostasis de las células endoteliales. En ese sentido, se ha descrito que la interacción de PKC $\zeta$  con p62 a través de sus respectivos dominios PB1 provoca inflamación (Durán et al., 2004; Nigro et al., 2010) y apoptosis (Kim et al., 2012). Una de las vías más importantes por la que p62 media el estrés oxidativo es a través de la regulación de la vía Nrf2/Keap1. La proteína p62 contiene una región de interacción con Keap1 (KIR, del inglés “Keap1 Interacting Region”). Keap1 regula la actividad de Nrf2, en condiciones normales, gracias a la asociación física de ambas a través del dominio Nel2 de Nrf2, promoviendo la ubiquitinación de ésta y su posterior degradación por el proteasoma. Se ha observado que p62 compite por la unión de Keap1 a Nrf2, ya que el secuestro de Keap1 por p62 a través de su dominio KIR deja libre a Nrf2 para que lleve a cabo su función de incrementar la expresión de los genes relacionados con la respuesta antioxidante (Komatsu et al., 2010; Ichimura et al., 2013).

## 7. Papel del sistema Keap1-Nrf2 en la función endotelial

El sistema de la proteína asociada a ECH tipo *Kelch* (Keap1)/factor 2 asociado al factor nuclear eritroide (Nrf2) regula la expresión de una batería de genes citoprotectores en respuesta al estrés oxidativo (Itoh et al., 1997). Así, Keap1 sirve como sensor de ese estrés oxidativo junto con la ubiquitin ligasa E3, Cul3 (Motohashi & Yamamoto, 2004). En condiciones en las que no existe ningún tipo de estrés, Keap1 se encuentra unido a Nrf2 y constitutivamente lo ubiquitina provocando su degradación por la vía del proteasoma, manteniendo unos niveles bajos de Nrf2 (Fukutomi, Takagi, Mizushima, Ohuchi, & Yamamoto, 2014). Sin embargo, cuando la célula se encuentra sometida a un estrés oxidante, los compuestos electrófilos modifican los residuos reactivos de cisteína de Keap1 e impiden su actividad ubiquitin ligasa, provocando una estabilización de Nrf2 y su posterior translocación y acumulación en el núcleo. Esta acumulación nuclear de Nrf2 provoca su unión a unos elementos de respuesta antioxidante (ARE) que activan la transcripción de una serie de genes que codifican para enzimas antioxidantes, como serían Nqo1, HO-1 (Taguchi, Motohashi, & Yamamoto, 2011) y también, de p62 (Jain et al., 2015). Este sería el mecanismo de activación canónico de

Nrf2. En los últimos años, se han descrito una serie de mecanismos alternativos, como es el mediado por p62, que posee una región de interacción con Keap1 (KIR) que incluye la secuencia STGE de interacción con Nrf2 (Komatsu et al., 2010; Lau et al., 2010). Varias condiciones de estrés inducen la fosforilación de p62 en el residuo de serina 349, que se encuentra dentro de la región KIR, provocando un incremento en la afinidad de unión a Keap1. De este modo, p62 fosforilada compite con Nrf2 y bloquea la unión de Nrf2 y Keap1, provocando una mayor acumulación de Nrf2 y una mayor respuesta antioxidante (Jain et al., 2010; Ichimura et al., 2013). A su vez, Keap1 formando un complejo con p62 fosforilada será degradada mediante un mecanismo de autofagia selectiva. Este mecanismo actúa retroalimentándose de manera positiva, ya que Nrf2 induce la expresión p62 (Fig. I7) (Taguchi et al., 2012; Jain et al., 2015).



**Figura I5. Activación de Nrf2.** El homodímero Keap1 reconoce una sola molécula de Nrf2 a través de los motivos Nrf2-DLGex y Nrf2-ETGE, que son indispensables para la ubiquitinación de Nrf2. La fosforilación por mTORC1 de la Serina 349 en el motivo KIR de p62 aumenta la afinidad de unión de p62 por Keap1, inhibiendo competitivamente la interacción entre Keap1 y Nrf2. Como resultado, Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo para inducir la expresión de una batería de genes que codifican proteínas y enzimas antioxidantes. Cabe destacar que p62 es una de las dianas de Nrf2, provocando un bucle de retroalimentación positiva (Katsuragi, Ichimura, & Komatsu, 2015).

Nrf2 presenta un papel muy relevante en la correcta función endotelial, debido a que una elevada concentración o una exposición prolongada de ROS puede afectar al sistema vascular induciendo una disfunción de las células endoteliales (Burke & Berk, 2015; Z. Guo & Mo, 2020). Este incremento de ROS está relacionada con patologías como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, aterosclerosis, envejecimiento u obesidad, que se correlacionan de manera muy estrecha con la disfunción endotelial (Chen et al., 2015). Por tanto, la activación de la vía antioxidante Keap1/Nrf2 ayuda a proteger la función endotelial (Dai et al., 2007; Chen et al., 2015; Wang et al., 2017). Además, Nrf2 ayuda al mantenimiento de la integridad estructural del endotelio (Breuer et al., 2018; X. Ma et al., 2019) y promueve resistencia frente a aterosclerosis (M. Kim et al., 2012; Ricciotti et al., 2018).

## 8. Papel de la autofagia en la función endotelial

La autofagia (comerse a si mismo, en griego) es un proceso de degradación y reciclaje celular de macromoléculas citosólicas y orgánulos dañados (Kroemer, Mariño, & Levine, 2010). Además, el proceso de autofagia constituye un importante mecanismo de protección que permite que las células sobrevivan en respuesta a múltiples factores estresantes y ayuda a defender a los organismos contra enfermedades degenerativas, inflamatorias, infecciosas y neoplásicas (Galluzzi, Yamazaki, & Kroemer, 2018; Galluzzi & Green, 2019). Como proceso homeostático central, la autofagia contribuye al funcionamiento celular adecuado mediante la degradación y el reciclaje de los componentes citoplasmáticos en respuesta a la privación prolongada de nutrientes (Galluzzi et al., 2018). Recientemente, varios miembros de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), se han propuesto como importantes sensores de nutrientes, por lo que emergen como una nueva vía para la regulación de la autofagia (Husted, Trauelsen, Rudenko, Hjorth, & Schwartz, 2017).

En las células de mamíferos, existen tres tipos principales de autofagia dependiendo de cómo los productos a degradar sean transportados a los lisosomas: macroautofagia, microautofagia o autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés “chaperone-mediated autophagy”) (Ktistakis & Tooze, 2016). La macroautofagia (en lo sucesivo será denominada como autofagia) ha sido el mecanismo de autofagia más investigado y caracterizado. Durante este proceso, los componentes celulares a degradar son secuestrados en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma que finalmente se fusionará con los lisosomas (Juhász & Neufeld, 2006). Este proceso está inducido por un gran número de estímulos, como son la privación de nutrientes y otros estreses

celulares (Kroemer et al., 2010). La microautofagia, sin embargo, es un proceso mucho menos conocido que no requiere la formación de autofagosomas e implica la absorción directa de la carga por la invaginación de la membrana lisosomal (Galluzzi et al., 2017). Otro tipo de autofagia, es la autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés “chaperone-mediated autophagy”), que permite la degradación selectiva de proteínas que poseen una secuencia de aminoácidos determinada (motivo KFERQ). Este motivo es reconocido por la chaperona Hsc70 y tras la unión con el receptor de la proteína de membrana de tipo 2A (LAMP2A, del inglés “lysosome-associated membrane protein type 2A”), presente en la membrana lisosomal, permite la translocación de la proteína al interior del lisosoma para su degradación (Galluzzi et al., 2017; Tekirdag & Cuervo, 2018). Todos los procesos de autofagia finalizan en los lisosomas, que muestran más de 60 hidrolasas ácidas capaces de catabolizar completamente lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y polipéptidos. Los productos que se obtienen tras el proceso de degradación estarán disponibles para reacciones metabólicas o procesos de reparación (Boya, 2012).

El receptor de autofagia de mamíferos más conocido es p62/SQSTM1, en lo sucesivo denominado p62. Es una proteína multidominio capaz de interactuar a través de sus diferentes regiones y motivos con una amplia variedad de proteínas de señalización para regular múltiples funciones y procesos celulares, incluida la autofagia (Moscato, Diaz-Meco, & Wooten, 2009). Como explicamos en apartados anteriores, p62 tiene un dominio PB1 que juega un papel crucial en su auto-oligomerización, necesaria para su reclutamiento en el lugar de formación del autofagosoma (Itakura & Mizushima, 2011). Además, p62 contiene otras regiones importantes como son el motivo LIR, que permite su propia degradación y su interacción con la proteína LC3 (conocida en inglés como “microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta”) (Komatsu et al., 2010), el dominio UBA (del inglés “Ubiquitin-associated”) que permite el reclutamiento y degradación por el autofagosoma de proteínas ubiquitinadas (Duran et al., 2011), y por último el motivo KIR, implicado en la asociación con Keap1 (Komatsu et al., 2010; Lau et al., 2010). Como se mencionará en esta tesis, en nuestro laboratorio hemos descrito que Gαq está presente en compartimentos autofágicos, y lisosomas, formando parte del complejo multimolecular mTORC1, contribuyendo a su ensamblaje y activación a través de su interacción con p62, que se modula por la disponibilidad de nutrientes (Cabezudo et al., 2020, en revisión).

La autofagia juega un papel esencial en la correcta función endotelial. Se ha demostrado que la autofagia regula los niveles de óxido nítrico en situaciones de estrés

de flujo en monocapas de células endoteliales de la arteria carótida “*ex vivo*” (F. Guo et al., 2014), así como en procesos de envejecimiento (Larocca et al., 2012). Se ha descrito que cambios en estrés de flujo correlacionan con un incremento en los marcadores de autofagia, p62 y LC3 (F. Guo et al., 2014). De manera interesante, los niveles de p62 también están reducidos en las células endoteliales de la arteria braquial de personas mayores, en comparación con los individuos más jóvenes, con un incremento del estrés oxidativo y la inflamación (Larocca et al., 2012). Además, en condiciones de estrés de flujo, la autofagia es necesaria para promover la alineación de las células endoteliales con el flujo y protegerlas frente a apoptosis o senescencia, e impedir la formación de placas aterogénicas (Vion et al., 2017). De manera similar, el tratamiento con el compuesto curcumina, que tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, induce autofagia en células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVECS, del inglés “human umbilical vein endothelial cells”) expuestas a peróxido de hidrógeno, incrementando los niveles de LC3II y el número de autofagosomas, promoviendo un incremento de la viabilidad celular (Han et al., 2012). Otros estudios han demostrado que la proteína Rab26, una GTPasa inductora de la autofagia, protege la barrera endotelial pulmonar estabilizando las uniones adherentes (H. Li et al., 2017; Dong et al., 2018). Existe un gran número de estudios que sugieren que la autofagia es necesaria para una respuesta vascular adecuada y la desregulación de la autofagia puede conducir a un endotelio disfuncional.

Por lo tanto, se necesita una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la interconexión entre estrés oxidativo, inflamación, ateroprotección y autofagia. Dada la estrecha relación que existe entre los procesos de autofagia y la regulación del estrés oxidativo, y que en ambos intervienen proteínas con dominios PB1, resulta de gran interés estudiar el papel del nuevo interactoma de Gαq en ambos procesos, a través de su interacción con proteínas con estos dominios, y determinar su posible repercusión en la hemostasis endotelial y patologías vasculares.

## **OBJETIVOS**

Este trabajo pretende contribuir a una mejor comprensión de las funciones celulares integradas de Gαq a través de su complejo interactoma con distintos efectores. Además de la región implicada en la interacción con sus efectores canónicos, nuestro grupo ha descrito que Gαq presenta una región (denominada “PB1-like”) capaz de interactuar con proteínas que presentan dominios PB1, que actuarían como nuevos efectores, pudiendo estar implicados en diferentes respuestas celulares.

Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

1. Generación y caracterización de modelos animales “knock-in” para investigar el papel del interactoma dependiente de la región de interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 en contextos fisiológicos.
2. Estudiar el papel de la región de interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 en la hemostasis y la permeabilidad vascular *in vivo*.
3. Determinar la repercusión del nuevo interactoma de Gαq en los mecanismos moleculares implicados en la modulación de autofagia.
4. Investigar el papel de Gαq en la regulación de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2 y explorar el interactoma implicado.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## MATERIALES

### Tampones y disoluciones

TAMPÓN	COMPOSICIÓN	ESPECIFICACIONES
ADN tampón de muestras 6x	18% (v/v) Glicerol 0,15% (m/v) Azul de Bromofenol 0,15% (m/v) Xilencianol 15 mM EDTA	
Tampón PD	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,25% Desoxicolato de sodio 1 mM EGTA pH 8,0 1 mM NaF  0,2 $\mu$ M PMSF 0,5 $\mu$ M Benzamidina 1 $\mu$ g/ $\mu$ l Aprotinina $\mu$ M NaVO <sub>3</sub>	Almacenar a 4°C. En el momento de uso añadir mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas.
Solución de tinción de azul de Coomassie	0,1% (m/v) Azul de Coomassie R250 10% (v/v) Ácido acético 50% Metanol 40% (v/v) H <sub>2</sub> O	
Solución desteñidora de azul de Coomassie	10% (v/v) Ácido acético 50% (v/v) Metanol 40% (v/v) H <sub>2</sub> O	

Earl's Balance Salt Solution (EBSS)	1 g/L D-Glucosa 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> 0,4 g/L KCl 6,8 g/L NaCl 0,6 g/L H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,26 g/L CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,2 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	
LB broth	1% (m/v) Bacto-triptona 0,5% (m/v) extracto de levadura 1% (m/v) NaCl (171 mM)	
Solución de tinción Ponceau S	0,2% <i>Ponceau S</i> en 3% TCA	
Tampón de electroforesis (10x)	0,25 M Tris base 2,0 M Glicina 1% SDS	
Cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas	0,1 µM PMSF 0,5 µM Benzamidina 1 µg/µl Aprotinina 0,1µM NaVO <sub>3</sub> 10 µg/ml STI 10 µg/ml Bacitracina	
Tampón de carga 4x	200mM Tris pH 6,8 40% (v/v) Glicerol 0,15% (m/v) Azul de Bromofenol 4% (m/v) SDS 5% (v/v) β-Mercaptoetanol	

Tampón RIPA (1x)	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 150 mM NaCl 1% Triton-X100 0,1% SDS 0,5% Desoxicolato de sodio	
Gel concentrador de poliacrilamida (4%)	Acrilamida/ N,N'metilenbisacrilamida 30:0,8 (m/v) 0,25 M Tris-HCl pH 6,8 0,1% SDS	
Gel separador de poliacrilamida (6-13%)	Acrilamida/ N,N'metilenbisacrilamida 30:0,8 (m/v) 0,25 M Tris-HCl pH 8,5 0,1% SDS	
Tampón TAE (1X)	40 mM Tris-acetato pH 7,6 1 mM EDTA	
TBS (10X)	0,1 M Tris base 1,5 M NaCl Equilibrar pH 7,4 con HCl	
TBS-Tween (10x)	0,1 M Tris base 1,5 M NaCl 0,2% Tween-20 Equilibrar pH 8,0 con HCl	

PBS (1X)	137 mM NaCl (0,8% w/v) 2,7 mM KCl (0,02% w/v) 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,144% w/v) 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,024% w/v) pH 7,4	
Tampón de transferencia (10x)	0,2 M Tris base 1,5 M Glicina 20% Metaol (v/v)	

### Oligonucleótidos

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO
Gq E234A FW	5' - CTAGTAGCGCTTAGTGCATATGATCA- AGTTCTCGTGG - 3'
Gq E234A REV	5' - CCACGAGAACTTGATCATATGCACTAAGCGC- TACTAG - 3'
Gq E245A FW	5' - CGTGGAGTCAGACAATGCGAACCGAATGGAG- GAAAGC - 3'
Gq E245A REV	5' - GCTTTCCTCCATTTCGGTTCGCATTGTCT- GACTCCACG - 3'
Gq Q209L FW	5' - GATGTAGGGGGCCTAAGGTCAGAGAGA -3'
Gq Q209L REV	5' - TCTCTCTGACCTTAGGCCCCCTACATC -3'
Gq P185A FW	5' - GCTTAGAGTTTCGAGTCGCCACCACAGGGAT- CATCG -3'
Gq P185A REV	5' - CGATGATCCCTGTGGTGGCGACTCGAACTC- TAAGC -3'
Gq T187A FW	5' - GAGTTCGAGTCCCCACCGCAGGGATCATCGA- ATACC -3'
Gq T187A REV	5' - GGTATTCGATGATCCCTGCGGTGGGGACTC- GAACTC -3'
Gq G188A FW	5' - CGAGTCCCCACCGCAGCGATCATCGAA- TACCCC -3'
Gq G188A REV	5' - GGGGTATTCGATGATCGCTGCGGTGGG- GACTCG -3'
Gq PTG FW	5' - GAGTTCGAGTCGCCACCAGCGATCATCGA- ATACC -3'

Gq PTG REV	5'- GGTATTTCGATGAT <u>CGCTGCGGTGGCG</u> ACTC-GAACTC -3'
Gnaq 5'-FW	5'- CCTGAGCTCGTCCCTGA -3'
Gnaq 5'-REV	5'- GACTTGCCACTCTCCCCTGTCC -3'
Gnaq 3'-FW	5'- ATCCTGCAGCTGAACCTGAAGGAGTAC -3'
Gnaq 3'-RV	5'- CAAGGCTTCCTCAGCACCTTTCC -3'
HA screen FW	5'- TGACGTCCCCGACTACGCG -3'
BAC-HA RV	5'- GGGTATTTCGATGATCCCTGTAGT -3'
K-screen REV	5'- AGCAGTGTATCCATTCTCTCTCTCTGACC -3'
E-screen REV	5'- ACTTGATCATACGCGCTAAGCGCTAC -3'
Gq f/f 1	5'- AGCTTAGTCTGGTGACAGAAGC -3'
Gq f/f 2	5'- GCATGCGTGTCCTTTATGTGAG -3'
G11 wt 1	5'- GCCCCTTGTACAGATGGCAG -3'
G11 wt 2	5'- AGCATGCTGTAAGACCGTAG -3'
G11 KO 1	5'- CAGGGGTAGGTGATGATTGTGC -3'
G11 KO 2	5'- GACTAGTGAGACGTGCTACTTCC -3'
Tie2-Cre 1	5'- GAAGTCGCAAAGTTGTGAGTTG -3'
Tie2-Cre 2	5'- TGGCTTGACAGGTACAGGA -3'
Tie2-Cre 3	5'- GAGAATGGCGAGAAGTCACTG -3'
Hm 5'	5'- CGCGTGTGAGCAGGGCGCCGGCGGGGCTGC AGCGAGGCACTTCGGAAGAGGCCTGGTGATGAT- GGCGGGATCG -3'
Hm 3'	5'- GCAGCGGCGAGCCGGGGCGGGGGGTAC CGGGGCCCAAGGGCCGCACTCACTCAGAAGA- ACTCGTCAAGAAGGCG -3'
BAC-HA 1	5'- TGACGTCCCCGACTACGC -3'
BAC-HA 2	5'- GGGTATTTCGATGATCCCTGTAGT -3'

### Anticuerpos primarios

ANTÍGENO	REFERENCIA	DISTRIBUIDOR	ESPECIE	DILUCIÓN
$\alpha$ -Tubulina	YOL 1/34 (sc-53030)	Santa Cruz	Rata	WB (1:1000)
CD102	553325	BD Pharmingen	Rata	Sorting (3,3 $\mu$ g/ $\mu$ l)
CD16/CD32	553142	BD Pharmingen	Rata	Sorting (3,3 $\mu$ g/ $\mu$ l)
Erk1 (C-16)	sc-93	Santa Cruz	Conejo	WB (1:1000)
Erk2 (C-14)	sc-154	Santa Cruz	Conejo	WB (1:1000)
GAPDH	ab8245	Abcam	Ratón	WB (1:5000)
GFP	sc-9996	Santa Cruz	Ratón	WB (1:1000)
GFP	11814460001	Roche	Ratón	WB (1:1000) / IP (2,5 $\mu$ L/mg)
Gq/11 (C-19)	sc-392	Santa Cruz	Conejo	WB (1:500- 1:1000)
Gq (E-17)	sc-393	Santa Cruz	Conejo	WB (1:500- 1:1000)
Gq/11/14 (G-7)	sc-365906	Santa Cruz	Ratón	WB (1:500- 1:1000)
GRK2 (C-15)	sc-562	Santa Cruz	Conejo	WB (1:1000)
GRK2 PF2	Producido contra la región C-terminal	Nuestro laboratorio	Conejo	WB (1:500)
HA (F-7)	sc-7392	Santa Cruz	Conejo	WB (1:1000)
HA (F-7)- agarosa	sc-7392-AC	Santa Cruz	Ratón	IP (2,5 $\mu$ l/mg)
HA (Híbrido ma)	Clon 12CA5	Híbrido ma (SMOC)	Ratón	WB (1:500- 1:1000)

HO-1	ab68477	Abcam	Conejo	WB (1:1000)
Keap1	10503-2-AP	Proteintech	Conejo	WB (1:1000)
LC3B	2775	Cell Signalling	Conejo	WB (1:1000)
LC3B	2775	Novus Biologicals	Conejo	WB (1:1000)
Nrf2 (C-20)	sc-722	Santa Cruz	Conejo	WB (1:500)
Nrf2 (A-10)	Sc-365949	Santa Cruz	Ratón	WB (1:500)
Nrf2	ab62352	Abcam	Conejo	WB (1:1000)
p62	BML-PW9860	Enzo	Rabbit	WB (1:2000)
p62 C-TER	GP62-G	Progen	Cobaya	WB (1:1000)
VE-Cadherina	ab33168	Abcam	Conejo	WB (1:1000)

### Anticuerpos secundarios

NOMBRE, ANTÍGENO	DISTRIBUIDOR	DILUCIÓN
Alexa 555, goat anti-rat IgG	ThermoFischer	IF (1:500)
Biotin-conjugated donkey anti-mouse IgG	Jackson Immnunore-search	WB (1:50000)
Biotin-conjugated donkey anti-rabbit IgG	Jackson Immnunore-search	WB (1:50000)
IRDyeTM 680 LT, donkey anti-mouse IgG	Rockland	0,5 mg/ml
IRDyeTM 680 LT, goat anti-rabbit IgG	Rockland	0,5 mg/ml
IRDyeTM 680 LT, goat anti-goat IgG	Rockland	0,5 mg/ml
IRDyeTM 800 CW, donkey anti-mouse IgG	Rockland	0,5 mg/ml
IRDyeTM 800 CW, goat anti-rabbit IgG	Rockland	0,5 mg/ml
IRDyeTM 800 CW, goat anti-goat IgG	Rockland	0,5 mg/ml



Soluble rabbit peroxidase-anti-mouse IgG	Nordic immunology	1/50000
Soluble mouse peroxidase-anti-rabbit IgG	Nordic immunology	1/50000
Soluble mouse peroxidase-anti-goat IgG	Nordic immunology	1/50000
Streptavidin POD-conjugated	Roche	1/50000

Plásmidos

ADNc	VECTOR	ORIGEN
Gq	pcDNA3	Addgene
Gq wt	pCIS	Dr A. Aragay (IBMB, Spain)
Gq R183C	pCIS	Dr A. Aragay (IBMB, Spain)
Gq Q209L	pCIS	Dr A. Aragay (IBMB, Spain)
Gq R183C-E234/245-AA	pCIS	Generado en nuestro laboratorio
Gq T257E	pCMV	Dr T. Kozasa (The University of Tokio, Japón)
Gq W263D	pCMV	Dr T. Kozasa (The University of Tokio, Japón)
Gq Y261F	pCMV	Dr T. Kozasa (The University of Tokio, Japón)
Gq Y261F	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gq E234A	pCIS	Generado en nuestro laboratorio

Gq E234A	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gq D236A	pCIS	Generado en nuestro laboratorio
Gq D236A	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gq E245A	pCIS	Generado en nuestro laboratorio
Gq E245A	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gq E234/245-AA	pCIS	Generado en nuestro laboratorio
Gq E234/245-AA	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gq R183C-E234/245-AA	pcDNA3	Generado en nuestro laboratorio
Gα11	pcDNA3	Addgene
GFP-Flag-PB1-p62	pcDNA3	Dr. Bradford Berk (University of Rochester, NY, USA)
GRK2	pcDNA3	Dr J Benovic (The Kimmel Cancer Center, USA)
HA-p62	pcDNA3	Dr. Edward Campbell (University of Illinois at Chicago, USA)
pcDNA3	pcDNA3	Invitrogen
pMD2.G	pMD2.G	Addgene 12259 - Dr. Richard Iggo, University of St Andrews, Edinburgh, UK
pSD.44	psd44	Addgene 12252- Dr. Richard Iggo, University of St Andrews, Edinburgh, UK

psPAX2	psPAX2	Addgene 12260 - Dr. Richard Iggo, University of St Andrews, Edinburgh, UK
Psd44. Gq-wt	psd44	Generado como parte de esta tesis
Psd44. Gq-E234-E245-AA	psd44	Generado como parte de esta tesis
Psd44. Gq-D236A	psd44	Generado como parte de esta tesis
psd44 Gq-P185A	psd44	Generado como parte de esta tesis
psd44 Gq-T187A	psd44	Generado como parte de esta tesis
psd44 Gq-G188A	psd44	Generado como parte de esta tesis
psd44 Gq-PTG	psd44	Generado como parte de esta tesis

Tratamientos

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	PROVEEDOR
Tert-Butil-hidroquinona (tBHQ)	Induce la respuesta antioxidante a través de la activación de Nrf2	Sigma-Aldrich
Peptido activador PAR-1 (PAR-1)	Péptido activador del receptor de trombina subtipo PAR-1	Sigma-Aldrich
Histamina	Agonista de los receptores de histamina (H1 y H2)	Sigma-Aldrich
Lipopolisacárido (LPS) (O26:B6)	Componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que inyectado intraperitonealmente provoca sepsis	Sigma-Aldrich

## Reactivos

NOMBRE	PROVEEDOR
Colagenasa Tipo I	Gibco
DMEM	Gibco
DPX	VWR International
Dynabeads anti-Rata	Thermo Fisher (11035)
ECGS	Biorad
Evans Blue	Sigma-Aldrich
F12-HAMs	Gibco
Fibronectina	Sigma-Aldrich
Gelatina	Sigma-Aldrich
Heparina	Sigma-Aldrich
Lipofectamina 2000	Life Technologies
Maleato de pirilamina	Sigma-Aldrich
Metafecteno	Biointex
Mowiol	DABCO
Opti-MEM	Gibco
Puromicina	Invitrogen
Tamoxifeno	Sigma-Aldrich
Vitrogen-100 (PureCol)	Advanced Biomatrix
TO-PRO-3	ThermoFisher

## Líneas celulares

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	ORIGEN
CHO-M3	Línea celular CHO que sobreexpresa de manera estable el receptor muscarínico M3	Dr AB Tobin (University of Glasgow, UK)
DREADD-Gq-HEK-293	Línea celular HEK-293 que sobreexpresa de manera estable el receptor DREADD-Gq	Amablemente cedidas por el Dr. Silvio Gutkind (UCSD) Generadas por el Dr. Bryan L. Roth (St. Louis School of Medicine, USA)
HEK-293	Células embrionarias de riñón humano 293	American Type Culture Collection

HEK-293T	Línea celular HEK-293 que sobreexpresa de manera estable el antígeno largo T del virus SV40 para incrementar la producción viral	American Type Culture Collection
MEF WT	Fibroblastos primarios de ratón inmortalizados	Dra. A. Aragay (IBMB, Barcelona)
MEF Gαq/11 KO	Fibroblastos primarios de ratón inmortalizados	Dra. A. Aragay (IBMB, Barcelona)
Psd44-Gq-E234/E245-AA KI MEF (Gq-EEAA KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis
Psd44-Gq-D236A KI MEF (Gq-D236A KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis
Psd44-Gq-P185A KI MEF (Gq-P185A KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis
Psd44-Gq-T187A KI MEF (Gq-T187A KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis
Psd44-Gq-G188A KI MEF (Gq-G188A KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis
Psd44-Gq-P185/T187/G188-AAA KI MEF (Gq-PTG KI MEFs)	Línea celular estable MEF	Generadas como parte de esta tesis

## MÉTODOS

### Modelos animales utilizados

El mantenimiento y la manipulación de los diferentes modelos animales transgénicos utilizados en este estudio se han realizado intentando minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados, de acuerdo con la normativa vigente (Directiva 63/2010/UE y RD 53/2013). Durante su alojamiento en el animalario los animales permanecieron en condiciones establecidas de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura, 45-55% de humedad, ritmo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con alimento y agua “ad libitum”, y bajo unas condiciones libres de patógenos. Todos los procedimientos

de experimentación han sido previamente autorizados (CEI61-1071-A075 y PROEX-339-14).

### ***Ratones $G\alpha_q$ f/f; tie2-Cre ER***

Los ratones *knockout* condicionales de  $G\alpha_q$  específicos de endotelio,  $G\alpha_q$  f/f; Tie2-Cre ER (Tie2CreERT2<sup>+</sup>;  $Gnaq^{fl/fl}$ ;  $Gna11^{-/-}$ ), fueron generados y proporcionados por el Dr. Stefan Offermanns (*Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Alemania*). Estos animales fueron generados a partir de ratones C57BL/6 deficientes en  $G\alpha_{11}$ . Parte de la secuencia de  $G\alpha_q$  se encuentra flanqueada con secuencias LoxP ( $G\alpha_q^{fl/fl}$ ) y además, poseen la recombinasa Cre que se expresa bajo el control específico de Tie2 en células endoteliales, que a su vez se encuentra acoplado a un dominio del receptor de hormonas esteroideas mutado que solo responde al ligando sintético tamoxifeno (Korhonen et al., 2009). De este modo, se produce una delección específica de  $G\alpha_q$  en el endotelio de los ratones tratados con tamoxifeno.

Los ratones  $G\alpha_q$  f/f; tie2-Cre ER fueron genotipados a partir de DNA genómico, obtenido a partir de la digestión de un fragmento de la cola del ratón utilizando para ello el kit de extracción de ADN, *Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega), mediante PCR usando los oligonucleótidos específicos (ver sección oligonucleótidos dentro de la sección de Materiales)

Para el análisis de PCR que nos permitía detectar la presencia  $G\alpha_q$  floxeado y la presencia o ausencia de  $G\alpha_{11}$  se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

#### Oligos específicos de $G\alpha_q$ floxeado,

Oligo  $Gq$  f/f 1: 5'-AGCTTAGTCTGGTGACAGAAGC-3'

Oligo  $Gq$  f/f 2: 5'-GCATGCGTGTCCCTTTATGTGAG-3'

#### Oligos específicos de $G\alpha_{11}$ ,

Oligo  $G11$  wt 1: 5'-GCCCCTTGTACAGATGGCAG-3'

Oligo  $G11$  wt 2: 5'-AGCATGCTGTAAGACCGTAG-3'

Oligo  $G11$  KO 1: 5'-CAGGGGTAGGTGATGATTGTGC-3'

Oligo  $G11$  KO 2: 5'-GACTAGTGAGACGTGCTACTTCC-3'

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (Fig. MM1). Los tamaños de los diferentes productos de PCR se indican a continuación en la siguiente tabla:

PCR	Gel	Tamaño bandas	Marcador
Gnaq Flox	2%	Flox: 700 pb, wt: 600pb	Φ29
Gna11 WT	2%	820 pb	Φ29
Gna11 KO	2%	450 pb	Φ29

Las condiciones de la reacción de PCR se indican en la siguiente tabla:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	3 minutos
2	35	95°C	30 segundos
		60.5°C	45 segundos
		72°C	1 minutos
3	1	72°C	10 minutos
4	1	4°C	∞

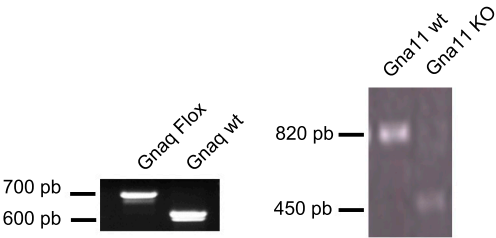


Figura MM1. Genotipado de ratones EC-Gαq KO.

Para el análisis de la presencia de la recombinasa, Tie2-Cre, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para realizar la PCR:

Tie2-Cre 1: 5'-GAAGTCGCAAAGTTGTGAGTTG-3'

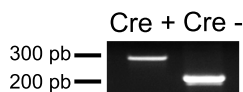
Tie2-Cre 2: 5'-TGGCTTGCAGGTACAGGA-3'

Tie2-Cre 3: 5'-GAGAATGGCGAGAAGTCACTG-3'

Este ensayo no nos permitirá distinguir los animales transgénicos homocigotos para Cre de los heterocigotos. El resultado de la PCR se analizó en geles de agarosa

al 3%. (Fig. MM2). Los tamaños de los diferentes productos de PCR se indican a continuación en la siguiente tabla:

PCR	Gel	Tamaño bandas	Marcador
Cre +	3%	350 p.b.	pUC19
Cre -	3%	200 p.b.	pUC19



**Figura MM2. Genotipado de ratones EC-Gαq KO.**

Las condiciones de la reacción de PCR se indican en la siguiente tabla:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	3 minutos
2	35	94°C	30 segundos
		51.7°C	60 segundos
		72°C	60 segundos
3	1	72°C	2 minutos
4	1	4°C	∞

### ***Generación de ratones BAC Gαq wild type; Gαq flf; tie2-Cre ER y BAC Gαq EEAA; ; Gαq flf; tie2-Cre ER***

Se generaron ratones “knock-in” sobre el modelo ratones *knockout* condicional de Gαq en endotelio (Gαq f/f; Tie2-Cre ER), mencionado en el apartado anterior, para comparar funciones fisiológicas en ratones que expresen la proteína HA-Gαq funcionalmente íntegra (*wild type*, ratones Gαq wt KI) o el mutante HA-Gαq-EEAA deficiente en la interacción con dominios PB1 (ratones Gαq-PB1 mut KI). Estos animales se llevaron a cabo en colaboración con Guzmán Sánchez y Nina Wettschureck en el laboratorio del Dr. Stefan Offermanns.



## Construcción de vectores específicos

### Generación del rslp-Neo cassette

Para generar el fragmento de DNA lineal, que contiene el *cassette* de resistencia a estreptomycin a y kanamicina, que será recombinado dentro de nuestro BAC se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para la amplificación mediante PCR. En primer lugar se eligieron 50 nucleótidos directamente adyacentes al extremo 5' del primer exón del DNA antes del codón de inicio de Gnaq y a continuación se le añade una secuencia establecida por el proveedor que amplificará el *rpsL-Neo selection cassette*, este será el oligonucleótido rpsL-Neo sentido. El oligonucleótido rpsL-Neo antisentido se generó utilizando una secuencia reversa y complementaria de los 50 últimos nucleótidos del extremo 3' del primer exón de Gnaq seguido de la secuencia ofrecida por el proveedor para amplificar la región 3' del *rpsL-Neo selection cassette*.

Oligonucleótido	rpsL-Neo	sentido:
5' - C G C G T G T G A G C A G G G C G C C G G C G G G G C T G C		
AGCGAGGCACTTCGGAAGAGGCCTGGTGATGATGGCGGGATCG-3'		

Oligonucleótido	rpsL-Neo	antisentido:
5' - G C A G C G G C G A G C C G G G G C G G G G G G T A C		
GGCCCAAGGGCCGCACTCACTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'		

El producto que se obtuvo de la PCR se utilizó posteriormente para la recombinación del *rpsL-Neo selection cassette* dentro del BAC RPCI-23-342.

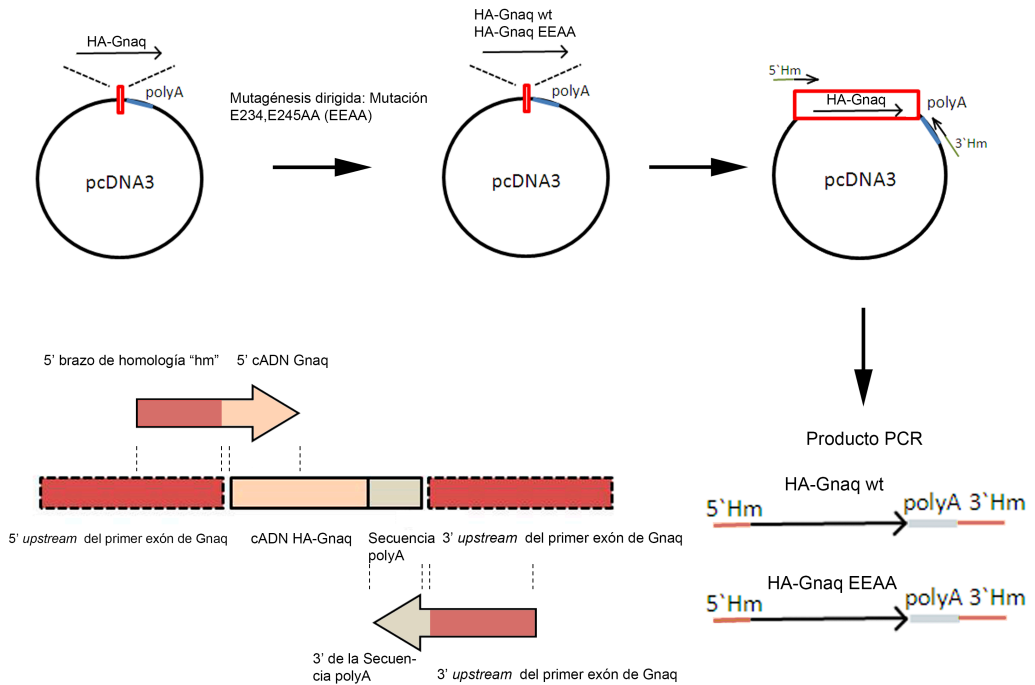
### Generación del ADNc de Gnaq con la etiqueta HA

Para generar el ADNc de Gnaq que posee una etiqueta HA y está flanqueada por las secuencias de los brazos largos de homología, estas secuencias mediarán la recombinación homóloga entre la secuencia de DNA lineal que generaremos y el cromosoma artificial bacteriano (BAC), se utilizó el plásmido pcDNA3 que contiene el ADNc de Gnaq junto con HA seguido de una secuencia *polyA*. Para generar el oligonucleótido sentido, se utiliza una secuencia de 50 pares de bases que este dentro del primer exón de Gnaq antes del codón de inicio, este será el brazo de homología 5', seguido de 30 pares de bases de la región complementaria 5' del ADNc de Gnaq. El oligonucleótido antisentido se generó con la secuencia complementaria de la región *polyA* dentro del ADNc de Gnaq seguido de 50 pares de bases de la región 3' final del primer exón de la secuencia genómica de Gnaq.

Oligo Hm 5':  
 5'-CGCGTGTGAGCAGGGCGCCGGCGGGGCTGCAGCGAGGCAC  
 TTCGGAAGAATGACTCTGGAGTCCATCATGGCGTGCTGCC-3'

Oligo Hm 3':  
 5'-GCAGCGGCGAGCCGGGGCGGGGGGTACCGGGGCCCCAAGGG  
 CCGCACTCAC CAGCTGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGCCATAG

El producto que se obtuvo de la PCR se utilizó posteriormente para la posterior transformación y recombinación dentro las bacterias que contienen el BAC de interés junto con el plásmido pRed/ET.



**Figura MM3. Esquema del diseño y estrategia de clonaje de los productos de PCR a insertar en el BAC.**

### Generación de los BACs modificados

Los vectores para generar un vector con la construcción que sobreexpresa el ADNc de Gnaq junto con la etiqueta HA fueron contruidos gracias al kit *Counter-Selection BAC Modification (Gene Bridges)*. La secuencia genómica que contiene el primer exón de

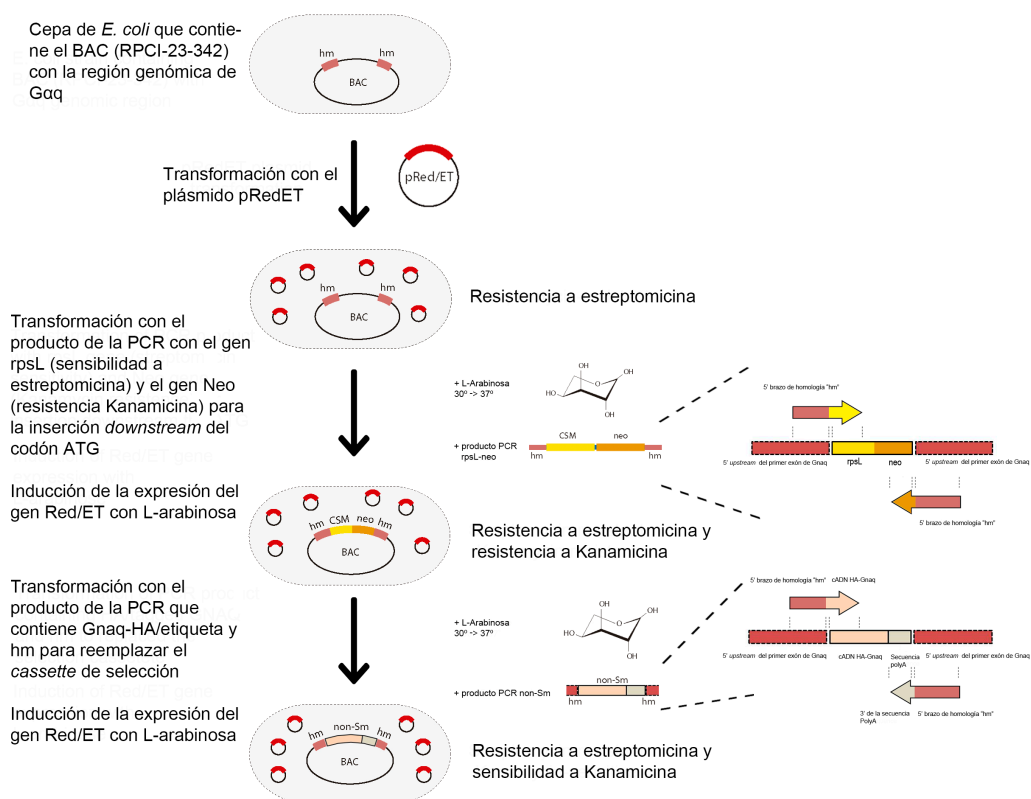
Gnaq donde se insertó en ADNc de Gnaq junto con la etiqueta de HA, situada próxima a la región 5' del ADNc, fue obtenida de un cromosoma artificial bacteriano llamado RPCI23-342P11. El proceso de generación se explicará de manera más detallada en la sección de Resultados. El esquema del flujo de trabajo se muestra a continuación.

Para la preparación del clon del BAC transgénico, el BAC RPCI-23-342 fue adquirido del *Children's Hospital Oakland Research Institute BACPAC Resources Center*. Este BAC contiene la región reguladora 5'UTR y los primeros y segundos exones e intrones del DNA genómico de Gnaq. La región del exón 1 que comprende desde el codón de inicio (ATG) hasta el final del exón 1, se reemplazó por una construcción que posee el ADNc de Gnaq junto con una etiqueta HA seguido de una secuencia *polyA* usando el sistema *Counter-Selection BAC Modification Kit (Gene Bridges)* que utiliza la técnica de recombinación *Red/ET*. Como se describió en los apartados anteriores, se generaron mediante PCR unas secuencias de homología (Hm) de 50 *nucleótidos* que flanquean la región del exón 1 a sustituir unidas al *cassette* de selección *rpsL*, y este producto de PCR fue electroporado en las bacterias que albergan el BAC que previamente fueron transformadas con el plásmido pRed/ET. Esto permitió la sustitución de la secuencia genómica con el *cassette* de selección *rpsL*-Neo a través de una recombinación homóloga.

En el siguiente paso, se utilizó el ADNc de Gnaq junto con sus brazos de homología que se describió en los apartados anteriores y se electroporó en las bacterias que contienen el BAC modificado con el *cassette* de selección correctamente recombinado y el vector de expresión pRed/ET. Esto nos permitió reemplazar el *cassette* de selección en BAC por nuestro ADNc de interés mediante la recombinación homóloga y la creación de un transgén de Gnaq con la etiqueta HA (Fig. MM4). El protocolo más detallado se encuentra en el manual de instrucciones para *Counter-selection BAC Modification Kit (Gene Bridges)*.

Se parte de los ratones *knockout* condicionales de Gαq específicos de endotelio, Gαq *f/f*; Tie2-Cre ER (Tie2CreERT2<sup>+</sup>; Gnaq<sup>*f/f*</sup>; Gna11<sup>*-/-*</sup>), que fueron generados y proporcionados por el Dr. Stefan Offermanns (*Max Planck Institute for Heart and Lung Research*). Para generar los ratones que posean un BAC que codifique para los genes de Gαq (*Gnaq*) se sustituyó el Exón (E1) de Gαq, a partir de la adquisición de una librería genética de *Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)*, librería RPCI-23-342 BAC, se generó un *cassette* que consistía en una secuencia HA insertada en el extremo 5' de la secuencia, seguido del *cDNA* de *Gnaq wt* y un *cDNA* de Gnaq al cual se realizó una

mutagénesis dirigida y se modificaron los residuos E234/245-AA, a continuación llevaba insertada una secuencia de poli-adenilación y además se encuentra flanqueado por secuencias de homología en los extremos 3' y 5'. Los *BAC* recombinantes correctos fueron verificados mediante *Southern blot*. Mediante la recombinación dirigida *FLPe*, los *BAC* recombinantes fueron inyectados en los pronúcleos masculinos derivados de los ovocitos FvB/N fertilizados. La progenie de animales transgénicos generados fue analizada para saber si tenían insertado el *BAC* mediante *PCR*.



**Figura MM4. Esquema del diseño y estrategia de inserción de los diferentes ADNc de Gnaq dentro del BAC.**

Los ratones BAC Gαq *wild type* y; Gαq f/f; tie2-Cre ER, fueron genotipados a partir de DNA genómico, obtenido a partir de la digestión de un fragmento de la cola del ratón (Matkovich, Diwan et al. 2006), mediante PCR usando los oligonucleótidos específicos (ver sección oligonucleótidos dentro de la sección de Materiales)

Para el análisis de la presencia  $G\alpha q$  floxeado, la delección de  $G\alpha 11$  y la presencia de Tie2-Cre se utilizaron los oligonucleótidos y las condiciones de PCR utilizadas en la sección anterior de  $G\alpha q$  f/f; tie2-Cre ER.

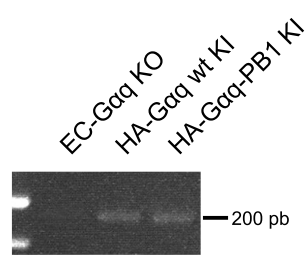
Para el análisis de la presencia del BAC de  $G\alpha q$  *wt* y el BAC  $G\alpha q$  emut (EEAA) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

BAC-HA 1: 5'-TGACGTCCCCGACTACGC-3'

BAC-HA 2: 5'-GGGTATTTCGATGATCCCTGTAGT-3'

Los tamaños de los siguientes productos de PCR se indican a continuación en la siguiente tabla.

PCR	Gel	Tamaño bandas	Marcador
BAC-HA	3%	200 p.b.	pUC19



**Figura MM5. Genotipado de ratones EC- $G\alpha q$  KO, HA-  $G\alpha q$  wt KI, HA- $G\alpha q$ -PB1 KI.**

Las condiciones de la reacción de la PCR se indican en la siguiente tabla:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	3 minutos
2	35	94°C	30 segundos
		51.7°C	60 segundos
		72°C	60 segundos
3	1	72°C	2 minutos
4	1	4°C	∞

## Técnicas de manipulación del ADN

### Secuenciación del ADN

Los plásmidos aislados fueron secuenciados por un servicio externo (Parque científico de Madrid) usando los oligonucleótidos específicos para verificar las mutaciones y la fidelidad de la secuencia completa del ADNc. Los cromatogramas fueron analizados con el programa *Chromas Lite 2.1* y los archivos en formato fasta con el programa Sequence Viewer para anotar la secuencia final y realizar los alineamientos de las secuencias de DNA.

### Mutagénesis del ADN

Las regiones específicas de la región de interacción de Gαq/11 con Keap1 fueron mutadas usando el kit de mutagénesis dirigida *QuickChange® Lightning* (Agilent Technologies). El procedimiento básico utiliza un plásmido de DNA de doble cadena superenrollado (dsDNA) con un inserto de interés y dos oligonucleótidos, cada uno es complementario a la cadena opuesta de la secuencia del inserto a la que deseamos realizar las mutaciones puntuales. Los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo con las guías del proveedor y amplificados por PCR usando los reactivos suministrados en el kit siguiendo las siguientes condiciones:

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2 minutos
2	18	95°C	20 segundos
		60°C	10 segundos
		68°C	7 minutos
3	1	68°C	7 minutos
4	1	4°C	∞

Los productos obtenidos de la PCR fueron tratados con la enzima de restricción DpnI durante 5 minutos a 37 °C para digerir el DNA molde parental. Para poder seleccionar el DNA que contiene las mutaciones, se transformaron las células supercompetentes de *E. coli XL1-Blue* con los vectores obtenidos anteriormente siguiendo las instrucciones del proveedor y las bacterias se sembraron en placas de agar con LB-ampicilina (50 µg/ml). Las colonias resultantes fueron crecidas en el medio LB *broth*-ampicilina (10 µg/ml) para la obtención de los plásmidos (*Promega spin Miniprep Kit*, Promega). Los plásmidos obtenidos fueron sometidos a una secuenciación del DNA para verificar las

mutaciones puntuales y la integridad de la secuencia del ADNc completo. Por último, se realizó una purificación del DNA plasmídico a gran escala (*maxi-prep*) usando el kit *Endofree Plasmid purification kit*<sup>®</sup> (Quiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor, y los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293 para comprobar la correcta expresión de los mutantes.

### ***Cuantificación del ADN***

Las concentraciones de las muestras de DNA fueron medidas con un espectrofotómetro *Nanodrop* y su *software* específico (*Thermo Scientific*). Además, también se midieron las concentraciones de DNA obtenidas del aislamiento de la banda del gel de agarosa al 1% (m/v).

### ***Electroforesis en gel de agarosa del ADN***

La determinación del tamaño y separación del DNA se lograron mediante una electroforesis en un gel de agarosa en TAE. Las muestras fueron corridas en geles de 0.8-1% de agarosa (*Invitrogen*) suplementados con el colorante de DNA *EZ Vision* (6X) (*AMRESCO*). Como marcadores del tamaño del DNA se utilizaron los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión de los fagos  $\lambda$  y  $\phi 29$ . Las muestras se corrieron a 0.01 Voltios/mm<sup>2</sup> y se visualizó usando un transiluminador de UV.

### ***Cultivo y manipulación de células de mamífero***

#### ***Cultivos primarios de células endoteliales de pulmón de ratón***

##### ***Animales de experimentación utilizados***

Para los cultivos primarios de células endoteliales primarias (MLECs) se emplearon ratones machos y hembras de 10 a 12 semanas de edad de la línea EC-G $\alpha$ q KO que fueron tratados con tamoxifeno (2 mg por dosis) inyectado de manera intraperitoneal durante 5 días consecutivos y se sacrificaron 14 días después del tratamiento.

##### ***Recubrimiento de las placas de cultivo***

Todos los *flasks* y las placas de cultivos fueron recubiertos con una mezcla compuesta por gelatina al 0,1%, fibronectina (10 $\mu$ g/ml) y colágeno (Vitrogen 100, 30 $\mu$ g/ml) durante mínimo 2 horas a 37°C. Antes de sembrar las células el medio de recubrimiento se aspiró y las placas se lavaron varias veces con PBS.

### Digestión de los pulmones con colagenasa

En condiciones estériles (bajo una campana de flujo laminar) se extrajeron pulmones de 4 ratones de un mismo genotipo. Los pulmones extraídos se colocaron en medio F12-Ham suplementado con penicilina/estreptomicina (0,01%/0,063%) y se les quitó los restos de grasa, tejido conectivo y coágulos de sangre. Tras un breve lavado en etanol al 70%, los pulmones se trocearon con ayuda de una hoja de bisturí y se sometieron a una digestión enzimática con colagenasa tipo I al 0,1% durante 1 hora a 37°C, agitando cada 10-15 minutos. La mezcla resultante se pasó cuatro veces a través de una aguja de 19,5G y posteriormente se filtró con un filtro celular de 70µm de poro (Falcon) para obtener una suspensión celular libre de restos de tejido (suspensión compuesta principalmente por macrófagos, fibroblastos y células endoteliales). Esta suspensión celular se sembró en *flasks* de cultivos de 75cm<sup>2</sup> en presencia de DMEM más F-12 Ham (1:1) suplementado con suero fetal bovino al 20% (v/v), glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina (0,01%/0,063%), heparina (100µg/ml) y ECGS (50µg/ml). Las células fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

### Selección Negativa

A las 48 horas de sembrar la suspensión celular obtenida tras la digestión enzimática de los pulmones, se realizó una selección negativa para eliminar los macrófagos, que son las principales células contaminantes del cultivo. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo anti FCγ-RII/III (10µl/3ml) y posteriormente se incubaron con una suspensión formada por un anticuerpo anti-rata acoplado a bolitas magnéticas (50µl/3ml) que reconoce específicamente al anticuerpo anterior. Tras esta incubación, las células se levantaron con tripsina y se realizó una selección en un imán durante 5 minutos. Las células adheridas al imán se desecharon y el resto de células de la suspensión no adheridas a la pared del tubo se volvieron a sembrar en *flasks* de cultivos.

### Selección positiva

Se realizó cuando en el cultivo se observaron colonias de células endoteliales de aproximadamente 20 células. Las células se incuban durante 30 minutos a 4°C con un anticuerpo anti ICAM-2 (10µl/3ml). Posteriormente el cultivo se incubó con una suspensión de anticuerpo anti-rata acoplado a bolitas magnéticas acopladas que reconoce específicamente al anticuerpo anti ICAM-2 durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual las células se levantaron con tripsina y se seleccionaron durante 5 minutos en el imán. En este caso, nos quedamos con las células adheridas a la pared del tubo. Las células se



resuspendieron en medio de cultivo y se volvió a realizar otra selección en el imán para asegurar una buena eliminación de los tipos celulares contaminantes. Finalmente, las células adheridas a la pared del tubo se sembraron en *flasks* de 75cm<sup>2</sup> recubiertos y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia, aproximadamente una semana después de la selección positiva.

### **Mantenimiento del cultivo primario**

Tras el aislamiento, las células se propagaron en placas de cultivo recubiertas con gelatina al 0,1%. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se levantaron con tripsina y se dividieron en nuevas placas de cultivo en una proporción de 1/3. Los cultivos se utilizaron hasta el séptimo pase.

### **Mantenimiento y subcultivo celular**

Las células MEF, HEK 293, DREADD-Gq-HEK-293 y HEK 293T fueron cultivadas en DMEM (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino (FBS, *Invitrogen*) al 10% (v/v), glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina (0.01%/0.063%) (v/v). Las células CHO que sobreexpresan de manera estable el receptor muscarínico M3 fueron cultivadas en *alphaMEM* sin nucleósidos (*Invitrogen*) suplementado con FBS al 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina (0.01%/0.063%) (v/v) y el antibiótico G418 para su selección. Las células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) se crecieron en medio DMEM:Ham's F-12 (1:1) suplementado con FBS al 20% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina (0.01%/0.063%), heparina (*Sigma-Aldrich*, 100 µg/ul) y ECGS (*BIO-RAD*, 50 µg/ml). Todas las líneas celulares fueron mantenidas incubadores a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Una vez alcanzaban la confluencia, para poder despegar las células para el subcultivo, se hizo un lavado con PBS y se incubaron con tripsina durante varios minutos a 37 °C. A continuación las células fueron resuspendidas en el correspondiente medio de cultivo y el pase apropiado se eligió en función de la línea celular, en general el rango de pase oscilaba entre 1:3 y 1:15.

### **Congelación y descongelación celular**

Las células expandidas en una placa de 10 cm hasta una confluencia aproximada de 80-90% fueron colectadas y resuspendidas en 1 ml de medio de congelación (90:10 FBS/DMSO) y se transfirieron a un crio tubo de 1.5 ml (*Nunc*). En primer lugar las células fueron guardadas a -20 °C durante 2 horas, después se guardaron a -80 °C

durante 2-3 días y finalmente se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo. Para la descongelación, las células se descongelaron rápidamente calentándolas a 37 °C en un baño de agua. La suspensión celular se transfirió a un tubo de 10 ml que contiene medio fresco y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 5 minutos para poder eliminar los restos de DMSO. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 10 ml de medio precalentado y transferido en una placa de cultivo de 10 cm.

### Transfección transitoria

#### *Método de fosfato de calcio*

Las células en sub-confluencia (60-70%) fueron transfectadas con 12-20 µg de DNA por placa de 10 cm. Antes de añadir a las células, el DNA se mezcló con 500 µl de tampón TE pH 8.0 y 568 µl de tampón HBS 2X en un tubo estéril. A continuación, se añadió gota a gota 70.4 µl de CaCl<sub>2</sub> y se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos. Después se añadieron 11.2 ml de medio completo a la mezcla de complejos de calcio y DNA y se vertió en la placa con las células subconfluentes. Las células fueron cultivadas con ese medio durante toda la noche (o/n), y al día siguiente se reemplazó por medio fresco completo y se mantuvieron las células durante 24 o 48 horas.

#### *Método de Lipofectamina*

##### Lipofectamina 2000

Las células en sub-confluencia (60-70%) fueron transfectadas con una combinación de las construcciones de ADNc, el reactivo *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*) diluido en OPTIMEM (*Gibco*), siguiendo las instrucciones del proveedor. El medio de transfección fue reemplazado a la mañana siguiente (o/n) por medio completo y las células se mantuvieron durante 24 o 48 horas.

##### Lipofectamina LTX

Las células en sub-confluencia (60-70%) fueron transfectadas con una combinación de las construcciones de ADNc, el reactivo *Lipofectamine LTX* (*Invitrogen*), reactivo *Plus* (*Invitrogen*) diluido en OPTIMEM (*Gibco*), siguiendo las instrucciones del proveedor. El medio de transfección fue reemplazado a la mañana siguiente (o/n) por medio completo y las células se mantuvieron durante 24 o 48 horas.

### ***Método de Metafecteno***

Las células en subconfluentes fueron transfectadas con una combinación de ADNc, *Metafectene* (*Biointex*) diluido en OPTIMEN (*Gibco*) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células se incubaron con el medio de transfección durante 6 horas y posteriormente se substituyó por medio completo y las células se mantuvieron durante 24 o 48 horas.

### **Generación de líneas celulares estables**

#### ***Generación de las líneas celulares estables de los mutantes de Gαq en el dominio PBI***

En primer lugar, el vector lentiviral psd44 para la expresión de Gαq-wt, Gαq-E234-245A (EEAA), Gαq-D236A fueron generados como se explica en la sección anterior de manipulación del DNA y utilizados en células MEFs Gαq/11 KO. Una vez las células empaquetadoras estaban subconfluentes se les realizó una transfección usando *Metafecten* (*Biointex*) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los diferentes plásmidos psd44 de interés fueron transfectados junto con psPAX2 (*Addgene 12260*) que contienen los principales genes de ayuda que se requieren para empaquetar: gag, proteasa, polimerasa, integrasa, tat, rev, y pMD2.G (*Addgene 12259*), necesario para el pseudotipaje con la glicoproteína VSV, permitiendo que las partículas virales puedan infectar las células. En todos los casos, la transfección se realizó en placas de 6 pocillos. El segundo día después de la transfección se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron para descartar el *debris* celular y se filtraron con un filtro de jeringa de 0.45 μm. El sobrenadante lentiviral junto con medio fresco (1:1) se añadió a las células de interés, células MEFs Gαq/11 KO que previamente fueron sembradas, junto con polibreno (Sigma, 10 μg/ml). El segundo día después de la transducción, las células fueron levantadas de las placas de 6 pocillos y resuspendidas en 3 ml de medio fresco. Cada una de las poblaciones transducidas fue transferida a una placa de 10 cm para amplificar el número de células infectadas. Al día siguiente, se comenzaron a seleccionar con el antibiótico de selección (puromicina) a una concentración de 1 μg/ml, que previamente se había testado su IC50. Solamente las células que contienen el plásmido de interés sobrevivieron a la puromicina. Todas las líneas celulares MEFs psd44-Gq-wt (Gq KI MEFs), psd44-Gq-EEAA (Gq-EEAA MEFs) y psd44-Gq-D236A (Gq-D236A MEFs) se mantuvieron bajo el tratamiento de puromicina (1 μg/ml).

### **Generación de las líneas celulares estables de los mutantes de $G\alpha_q$ en la región KIR**

En primer lugar, los vectores lentivirales psd44 para la expresión de  $G\alpha_q$ -P185A,  $G\alpha_q$ -T187A,  $G\alpha_q$ -G188A y  $G\alpha_q$ -P185-T187-G188A (PTG) fueron generados como se explica en la sección anterior de manipulación del DNA y utilizados en células MEFs  $G\alpha_q/11$  KO. Una vez las células empaquetadoras estaban subconfluentes se les realizó una transfección usando *Metafecten* (Biointex) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los diferentes plásmidos psd44 de interés fueron transfectados junto con psPAX2 (*Addgene* 12260) que contienen los principales genes de ayuda que se requieren para empaquetar: gag, proteasa, polimerasa, integrasa, tat, rev, y pMD2.G (*Addgene* 12259), necesario para el pseudotipaje con la glicoproteína VSV, permitiendo que las partículas virales puedan infectar las células. En todos los casos, la transfección se realizó en placas de 6 pocillos. El segundo día después de la transfección se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron para descartar el *debris* celular y se filtraron con un filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante lentiviral junto con medio fresco (1:1) se añadió a las células de interés, células MEFs  $G\alpha_q/11$  KO que previamente fueron sembradas, junto con polibreno (Sigma, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El segundo día después de la transducción, las células fueron levantadas de las placas de 6 pocillos y resuspendidas en 3 ml de medio fresco. Cada una de las poblaciones transducidas fue transferida a una placa de 10 cm para amplificar el número de células infectadas. Al día siguiente, se comenzaron a seleccionar con el antibiótico de selección (puromicina) a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , que previamente se había testado su IC50. Solamente las células que contienen el plásmido de interés sobrevivieron a la puromicina. Todas las líneas celulares MEFs psd44-Gq-P185A (Gq-P185A MEFs), psd44-Gq-T187A (Gq-T187A MEFs), psd44-Gq-G188A (Gq-G188A MEFs) y psd44-Gq-PTG (Gq-PTG MEFs) se mantuvieron bajo el tratamiento de puromicina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### **Obtención de explantes de hígado “*Ex vivo*”**

Los explantes de hígado recién recolectados de ratones macho alimentados se colocaron en placas con DMEM en presencia o ausencia del inhibidor de  $G\alpha_q/11/14$  (YM-254890, 40  $\mu\text{M}$ ), rapamicina (500 nM) o histamina (200  $\mu\text{M}$ ) y luego se transfirieron a un Incubador a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h, un protocolo adaptado de (Singh et al., 2009). Los explantes se homogeneizaron utilizando bolas metálicas en un *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) como se describió anteriormente (Lucas et al., 2014), y los lisados fueron usados para el análisis de inmunodetección de la

modulación de la vía mTORC1.

## Preparación de lisados celulares

### Obtención de lisados celulares

Para preparar los lisados celulares, las células fueron resuspendidas en 100-1000  $\mu$ l de un tampón de lisis con baja concentración de detergentes (tampón *PD*) (ver en sección de materiales) con sus correspondientes inhibidores de proteasas y fosfatasas, y fueron incubadas en una noria (250 r.p.m.) durante 1 hora a 4 °C. Tras ese tiempo los lisados fueron centrifugados durante 15 minutos a 4 °C en una microfuga (14000 r.p.m.) y los sobrenadantes, lisados clarificados, fueron guardados a -80 °C.

### Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de los lisados celulares fue determinada usando los reactivos *DC Protein Assay Reagents A, B, y S (Bio-rad)*. Se utilizaron 2  $\mu$ l de los lisados celulares clarificados que fueron mezclados con 25  $\mu$ l de una combinación de 20  $\mu$ l del reactivo S y 500  $\mu$ l del reactivo A. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l del reactivo B y la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro, *Bio-Rad iMark microplate Reader*. (Bio-Rad). La concentración de proteína se determinó gracias a la inferencia en una recta patrón con concentraciones de BSA conocidas. Por lo general se utilizaron concentraciones de 15-30  $\mu$ g de proteína total para *western blot*.

### Ensayo de inmunoprecipitación

Las co-inmunoprecipitaciones (Co-IP) de HA-Keap1 y G $\alpha$ q, los mutantes constitutivamente activos de G $\alpha$ q (G $\alpha$ q-R183C, G $\alpha$ q-Q209L); los mutantes de G $\alpha$ q en regiones de interacción (G $\alpha$ q-EEAA, G $\alpha$ q-QLAA, G $\alpha$ q-AA, G $\alpha$ q-D236A), y los mutantes G $\alpha$ q en las regiones de interacción con Keap1 (KIR) (G $\alpha$ q-P185A, G $\alpha$ q-T187A, G $\alpha$ q-G188A, G $\alpha$ q-PTG, G $\alpha$ q-QL-P185A, G $\alpha$ q-QL-T187A, G $\alpha$ q-QL-G188A, G $\alpha$ q-QL-PTG) fueron realizadas células previamente cultivadas y transfectadas en placas p60. Para realizar estas Co-IP previamente se necesitó lisar las células en un tampón de lisis con baja concentración de detergentes (tampón *PD*), con sus correspondientes inhibidores de proteasas y fosfatasas. La resina de agarosa conjugada al anticuerpo contra el péptido HA (Santa Cruz, 0.5 mg/ml) (10  $\mu$ l por condición) fueron utilizados para inmunoprecipitar HA-Keap1, y se añadió BSA (concentración final 10

mg/ml) para bloquear las uniones inespecíficas. La mezcla fue incubada en una noria (250 r.p.m.) durante 3 horas a 4 °C. Posteriormente la resina se lavó 10 veces con 10 ml del mismo tampón que se utilizó para lisar. A continuación, se añadió el tampón de preparación de muestras 4x a la resina lavada y las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 100 °C en un termobloque. Esas muestras posteriormente fueron analizadas por inmunodetección y la co-inmunoprecipitación fue detectada usando un anticuerpo contra Gαq/11 (C-19 y E-17).

Los experimentos de co-inmunoprecipitación entre las proteínas endógenas Keap1 y Gαq fueron desarrollados incubando 0.5 µg/ml del anticuerpo de Keap1 (*Proteintech*, 10503-2-AP) o 0.5 µg/ml del anticuerpo Gαq/11 (C-19) junto con 5 mg del lisado celular en presencia de BSA (10 mg/ml) en una noria (250 r.p.m. durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se añadieron 20 µl de la proteína G sefarosa (Santa Cruz, mezcla 1:1 de la proteína G sefarosa y el tampón de lisis) y se incubó durante 2 horas en las mismas condiciones anteriores. Posteriormente la resina se lavó durante 10 veces en 10 ml del tampón PD y se analizó mediante inmunodetección. La Co-IP se detectó usando anticuerpos contra Gαq/11 (C-19) y Keap1 (*Proteintech*, 10503-2-AP).

### Inmunodetección de proteínas tras electroforesis

Los lisados celulares e inmunoprecipitaciones fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS cuyos porcentajes oscilaban entre el 6% y el 13%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 mm, *Bio-Rad*) mediante una transferencia líquida en tampón de tris-glicina durante 90 minutos a 350 mA utilizando el sistema *Trans-Blot* (*Bio-Rad*). La eficiencia de la transferencia se evaluó mediante la tinción de la membrana con una solución del colorante rojo de *Ponceau*. Una vez realizada la tinción la membrana se realizó un escaneado de la misma, posteriormente se procedió a retirar el colorante de las membranas mediante un lavado con TBS-*Tween* al 0.1% (TBS-T) y después las membranas se bloquearon con una solución de BSA al 5% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. El siguiente paso fue la incubación de las membranas junto con los anticuerpos primarios diluidos en una solución del 3% de BSA en TBS durante toda la noche a 4 °C (ver en materiales las diluciones específicas de los anticuerpos). Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS-T y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado específico acoplado a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente (ver en materiales las diluciones específicas de los anticuerpos). A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante

10 minutos con TBS-T, una vez realizados los lavados se procedió a su revelado. Para el revelado se utilizó un sistema en el que la peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (ECL, *Amersham*). La cuantificación de la intensidad de la señal se realizó mediante densitometría láser con el sistema *GS-910 Calibrated Imaging Densitometer* (*Bio-Rad*). Otro método utilizado, es la utilización de anticuerpos secundarios fluorescentes, el sistema *Odyssey Infrared Imaging System*. En este otro método la intensidad de las bandas fue cuantificada con el *software Odyssey Infrared Imaging System*.

## Ensayos de función e integridad vascular “in vivo”

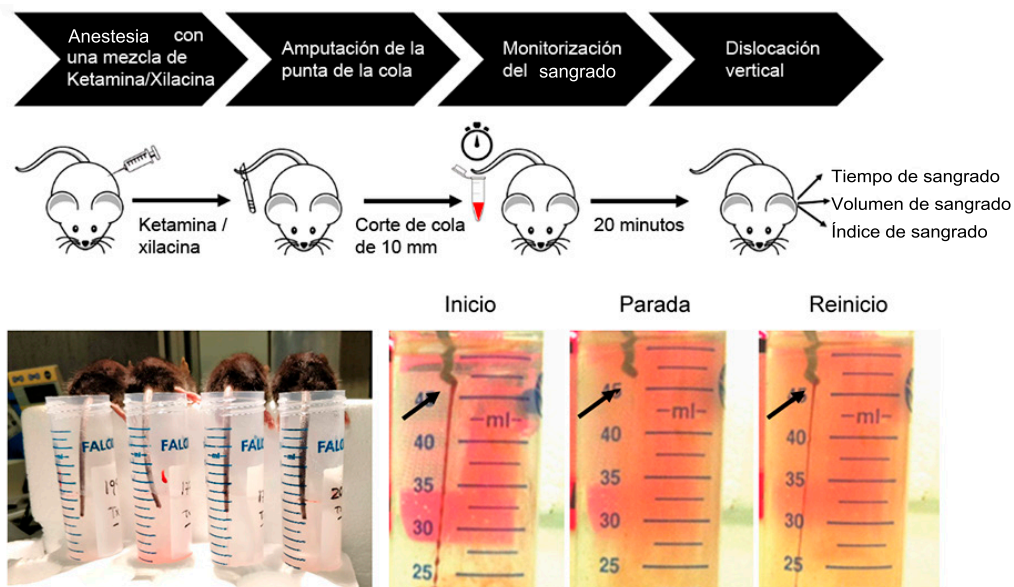
### Ensayo de sangrado en cola

Para realizar el ensayo de sangrado en cola los animales utilizados fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina y Xilacina (a 100 y 10 mg/kg, respectivamente), tras ser previamente pesados. Los animales se situaron en posición prona. Se les realizó un corte a 10 mm del segmento más distal de la cola con un bisturí. Inmediatamente la cola se sumergió en un tubo Falcon de 50 mL que contiene suero salino calentado a 37°C. La cola se posicionó con la punta 2 cm por debajo del cuerpo. Cada animal se monitorizó durante 20 minutos incluso aunque cesase el sangrado, por si volviese a sangrar de nuevo (*re-bleeding*). El tiempo de sangrado se determinó usando un cronómetro. Si el tiempo de sangrado se producía en ciclos de comienzo/parada de sangrado, se monitorizó la suma de los tiempos en los que estuvo sangrando dentro de los 20 minutos del ensayo. El experimento terminó al finalizar los 20 minutos o cuando el ratón perdía un volumen superior al 10% de su peso total para evitar la letalidad durante el experimento como fue requerido por el comité local de ética animal. El peso corporal, incluida la punta de la cola, se volvió a medir, y la pérdida de volumen de sangre durante el experimento se estimó por la reducción de peso corporal. Al final del experimento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los resultados se representaron en función del tiempo de sangrado (*Bleeding time*), volumen de sangrado (*Bleeding volumen*) y índice de sangrado (min x ml) (*Bleeding index*).

### Miles assay

Para realizar el ensayo de permeabilidad vascular inducido por histamina o ligando de PAR-1, se utilizó una modificación del ensayo de permeabilidad, “*Miles assay*”, como se describió anteriormente (Radu & Chernoff, 2013). En primer lugar, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con maleato de pirilamina (a 4 mg/





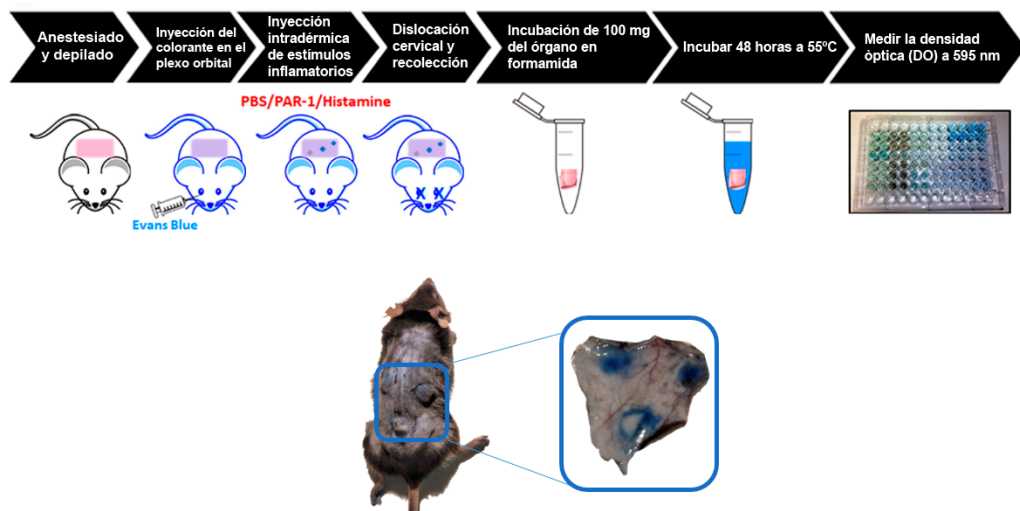
**Figura MM6. Representación esquemática del ensayo de sangrado en cola.** Imagen adaptada (Liu, 2012).

kg, Sigma) 30 minutos antes de la inyección con el colorante Evans Blue (EB) para reducir la permeabilidad residual durante el manejo. A los ratones se les inyectó 100  $\mu$ l de una solución al 0.5% del colorante Evans Blue en suero salino (Braun) a través de una inyección retro-orbital al seno venoso del ojo. A continuación, se realizaron una serie de inyecciones intradérmicas de histamina, ligando de PAR-1 o salino (50  $\mu$ l volumen total). Después de 30 minutos de la inyección intradérmica se recogen las muestras de la piel dorsal, aproximadamente una circunferencia de 10 mm, con un bisturí. Para extraer el colorante EB se sumergen las muestras en formamida (Sigma; 56°C durante 48 horas) para extraer el colorante de la piel. La cantidad de EB en cada una de las muestras se determinó midiendo la absorbancia a 620 nm. Los resultados fueron expresados como la cantidad de colorante Evans Blue (ng) por la cantidad de piel (mg) gracias a la regresión a partir de la recta patrón de EB.

### *Ensayo de permeabilidad vascular inducida por LPS*

Para realizar este ensayo de permeabilidad vascular inducido por lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con terbutil Hidroquinona (tBHQ) (Sigma, a 50 mg/kg) o vehículo. Pasadas las 24 horas, los ratones fueron inyectados con una mezcla de TBHQ (50 mg/kg) más LPS (Sigma, 50





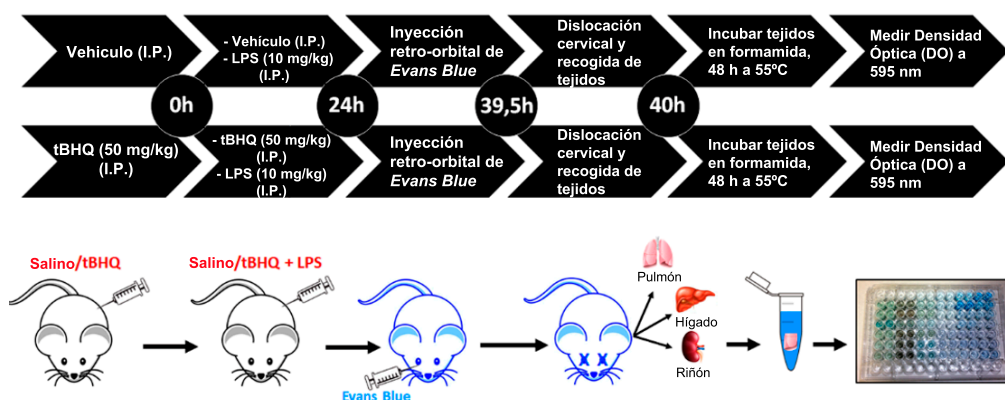
**Figura MM7. Representación esquemática del ensayo de Miles.**

mg/kg) o LPS (50 mg/kg). 17 horas después, a los ratones se les inyectó 100  $\mu$ l de una solución al 0.5% del colorante Evans Blue (EB) en suero salino (Braun) a través de un inyección retro-orbital al seno venoso del ojo. El colorante nos sirvió como control del efecto que produce el LPS en la permeabilidad de los tejidos. Después de 30 minutos de circulación del colorante EB por el torrente sanguíneo, el animal fue sacrificado y se recolectaron el hígado, riñones, pulmones. Se utilizaron 100 mg de cada uno de los tejidos extraídos. El colorante EB fue extraído con 200  $\mu$ l de formamida a 55 °C durante 48 horas. Se midió la concentración de colorante espectrofotométricamente (absorbancia a 610 nm y se convirtió a ng de colorante azul de Evans) y se normalizó con la masa del tejido (mg).

## Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes

### Inmunofluorescencia

Las células previamente fueron sembradas en cubreobjetos de cristal, previamente tratados con polilisina 1X (*Sigma*) o gelatina 1X (*Sigma*), y se les aplicaba el tratamiento previo requerido para cada tipo de experimento que se realizó. Los cubreobjetos en los cuales se sembraron las células fueron lavados en PBS, se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, y a continuación se retiró la solución y se volvieron a lavar con PBS. Para reducir la autofluorescencia de las células se utilizó un método de *Aldehyde quenching*, las células se incubaron con una solución de



**Figura MM8.** Esquema representativo del ensayo de inducción de sepsis por LPS.

10 mM de Glicina en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación, las células fueron lavadas con PBS. Para llevar a cabo la permeabilización de las células, estas fueron incubadas con una solución de *Triton X-100* al 0.5% en PBS durante 10 minutos. Para poder bloquear las uniones inespecíficas las células fueron incubadas con una solución que contenía BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. En el siguiente paso las células fueron incubadas con el anticuerpo primario de interés a 4 °C durante toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, después de que las células fueran lavadas 3 veces con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario específico en una cámara húmeda protegida de la luz durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS otra vez y se incubaron con *To-Pro-3* (*ThermoFisher*, 1:2000 en PBS) durante 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron montadas usando *Mowiol* (*Sigma*), se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad, una vez secas se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

### **Adquisición de imágenes**

Las imágenes de las muestras fueron adquiridas usando el microscopio invertido de fluorescencia, *Axiovert 200*, o el microscopio invertido laser confocal, *LSM510* (*Zeiss*), especificándolo en cada experimento. Los ajustes de adquisición (Objetivo, intensidad de los láseres, distancia de los planos) se mantuvieron en cada uno de los experimentos para permitir la credibilidad en la cuantificación de los análisis.

### **Cuantificación de imágenes**

Se utilizó el programa *Image J* para el análisis general de imagen y su manipulación. Los métodos de cuantificación de cada experimento se especificaron en la sección correspondiente de cada experimento.

### **Citometría de flujo**

#### ***Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS)***

La producción de especies reactivas de oxígeno se investigó a través de dos técnicas diferentes, *Cellular ROS/Superoxide detection assay kit* (ab139476, Abcam) y la sonda *CellROX™ Deep Red Reagent* (C10422, ThermoFisher).

El ensayo con el kit *Cellular ROS/Superoxide detection assay* se utilizó siguiendo el protocolo del fabricante. En primer lugar, 24 horas antes del ensayo se sembraron para que estuviesen las células a un 70% de confluencia. Las células se levantaron con tripsina y se resuspendieron en el tampón de lavado junto con los reactivos de detección de especies reactivas de oxígeno. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente las células fueron analizadas mediante citometría de flujo gracias al citómetro de flujo FACSCanto™ (BD Bioscience). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa FlowJo versión 9.6.4 (TreeStar).

El ensayo con la sonda *CellROX™ Deep Red* se realizó después de sembrar las células en placas de 12 pocillos para que estuviesen 24 horas después con una confluencia celular aproximada del 70%. Las células se tripsinizaron y resuspendieron con el reactivo *CellROX™ Deep Red* a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en medio completo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar el contenido de especies reactivas de oxígeno las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa FlowJo versión 9.6.4 (TreeStar).

### **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron representados como los valores  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes a no ser que se indique en la leyenda de la figura de otro modo. El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el programa informático Graphpad Prism 6 (Graphpad Software Inc.). Todos los test estadísticos comparativos de los datos fueron realizados usando la t-test de Student con dos colas no pareada o ANOVA para las comparaciones entre dos o más grupos respectivamente. Los datos

con valores  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

## **RESULTADOS**

## 1. Generación de los modelos de ratón HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI para investigar el papel de la interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 en la función vascular.

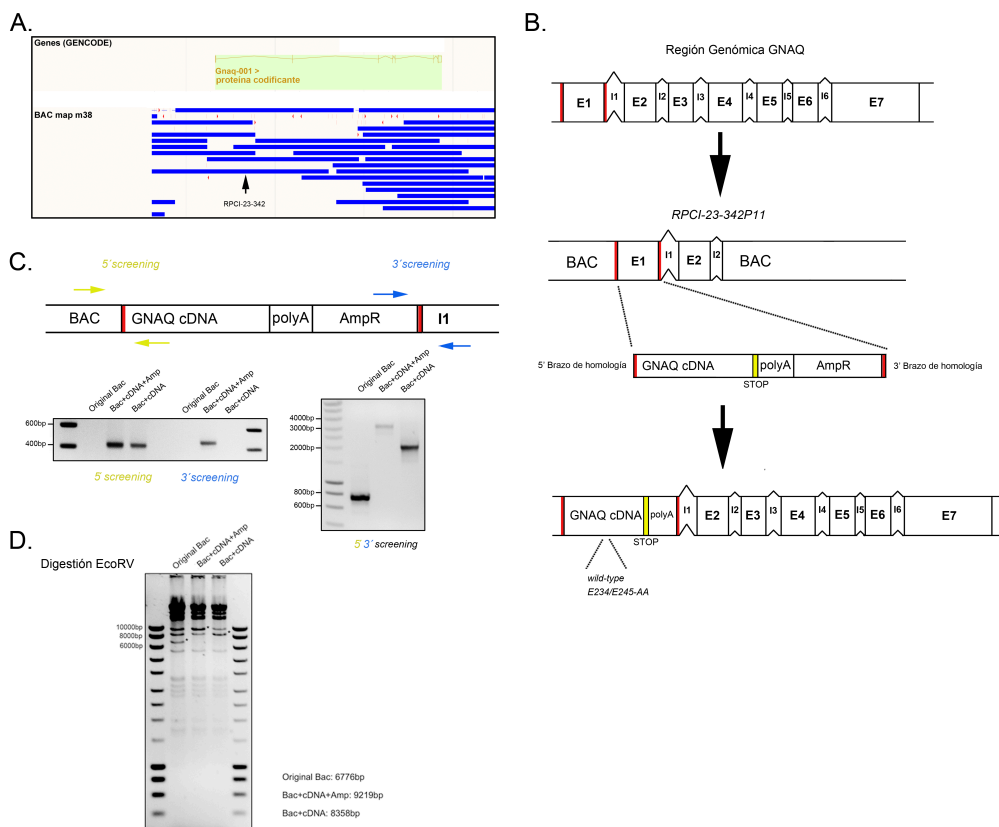
Como se ha descrito en la Introducción, las funciones celulares de Gαq implican un complejo interactoma con distintos efectores. Además de la región implicada en la interacción con sus efectores canónicos, nuestro grupo ha descrito que Gαq presenta una región (denominada “PB1-like”) capaz de interactuar con proteínas que presentan un dominio PB1 tales como PKCζ y p62, que actúan como nuevos efectores de Gαq en el control de la vía ERK5 o de mTORC1/autofagia, respectivamente (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Cabezudo, S. *et al.*, 2020, en revisión). La mutación de residuos específicos en la región de unión a dominios PB1 de Gαq (los mutantes denominados Gαq-EEAA (Gαq-E234A/E245A)) disminuye marcadamente su capacidad de interactuar con esos efectores no canónicos (Sánchez-Fernández *et al.*, 2016; Cabezudo, S. *et al.*, 2020, en revisión). Con el objetivo de investigar el papel funcional de ese nuevo interactoma de Gαq en contextos fisiológicos, optamos por una estrategia “knock-in”, que permite comparar funciones fisiológicas en ratones que expresen la proteína HA-Gαq funcionalmente íntegra (*wild-type*, ratones Gαq wt KI) o el mutante HA-Gαq-EEAA deficiente en la interacción con dominios PB1 (ratones Gαq-PB1 mut KI) en modelos animales en los que se pueda eliminar de forma condicional Gαq endógena en un determinado tejido o tipo celular.

En concreto, el contexto escogido fue el endotelio vascular, por varias razones. En primer lugar, está bien descrito que Gαq tiene un papel importante para el correcto funcionamiento del endotelio vascular. Un gran número de GPCRs median sus efectos intracelulares en este tipo celular a través de Gαq/11, como receptores que aumentan la permeabilidad vascular en respuesta a histamina o trombina (Korhonen *et al.*, 2009; Mikelis *et al.*, 2015). Por otra parte, las proteínas con dominios PB1 también se han implicado en el correcto funcionamiento endotelial (Burke & Berk, 2015). Finalmente, se podía disponer como punto de partida de ratones Gαq *f/f*; tie2-Cre ER (Korhonen *et al.*, 2009) cedidos por el laboratorio del Dr. Stefan Offermanns (Max Planck Institute, Germany). Estos ratones son knock-out globales para la proteína homóloga Gα11 y se convierten en doble deficientes en Gαq/Gα11 en las células endoteliales tras el tratamiento con tamoxifeno (Indra *et al.*, 1999). La generación de animales “knock-in” sobre ese modelo permitiría por tanto estudiar posibles alteraciones en la función vascular de Gαq cuando se limita específicamente su capacidad de interactuar con

proteínas con dominios PB1.

### 1.1. Construcción de vectores BAC Gnaq wt y BAC Gnaq EEAA

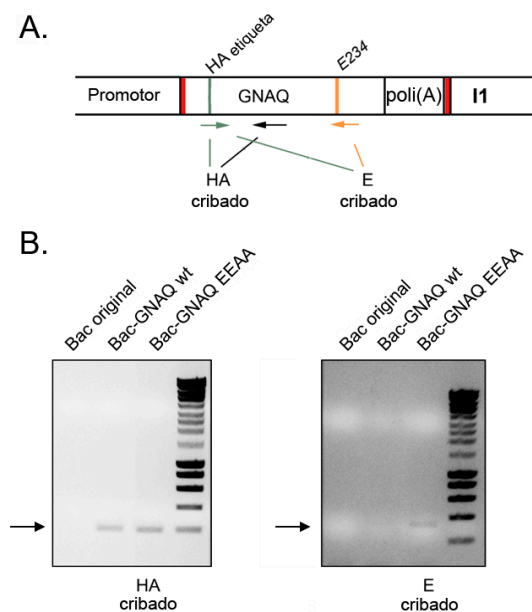
Para poder generar las construcciones que contengan los Cromosomas Artificiales Bacterianos (BACs, del inglés “Bacterial Artificial Chromosomes”) recombinantes, se insertó un ADNc del gen Gnaq de ratón con una etiqueta HA que contenía las dos versiones de interés, el ADNc G $\alpha$ q-wt y el ADNc con las mutaciones de interés insertadas. La región genómica dentro del BAC donde se insertó el ADNc está delimitada por unas secuencias que forman los brazos de homología (hm). Estas secuencias se corresponden en la región 5' a una secuencia de 50 nucleótidos previos al codón de inicio de Gnaq en el exón 1 y los 50 últimos nucleótidos de este mismo exón. Estos brazos de homología facilitarán la posterior recombinación. Dentro de la base de datos de *Ensembl* se seleccionó el BAC RPCI 23-342P11, que contiene los exones e intrones 1 y 2 de Gnaq (Fig. R1A). Para la posterior recombinación de nuestro ADNc dentro del BAC se utilizó *Counter-Selection BAC Modification Kit (Gene Bridges)* a través de la recombinación mediada por la recombinasa Red/ET, tal como se describe de manera más detallada en una sección específica de Materiales y Métodos. Después de este proceso, se obtuvieron los diferentes BACs. Con el objetivo de comprobar la correcta recombinación y orientación del ADNc insertado se realizaron una serie de PCRs con tres combinaciones de oligonucleótidos (5'-sentido/antisentido, 3'-sentido/antisentido y 5'-sentido/3'-antisentido, Fig. R1C), y se observó el patrón de digestión del BAC original y de los modificados, mediante un análisis de restricción con la enzima EcoRV. Este análisis permite detectar los tamaños específicos de las bandas principales de digestión, marcados con asteriscos en la Figura R1D.



**Figura R1. Diseño y generación de vectores BAC HA-Gnaq wt y BAC HA-Gnaq EEAA.** (A) Representación esquemática de la estructura genética de Gnaq y de parte del mapa del Cromosomas Artificiales de Bacteria (BAC), BAC m38, que portan los diferentes fragmentos del gen. El locus de ratón Gnaq que codifica para Gαq contiene 7 exones (líneas verticales amarillas). Dentro de la región genómica en la que se encuentra Gnaq aparecen diferentes BACs delimitados como cajas azules. El BAC RPCI-23-342, que abarca la región de Gnaq comprendida entre el primer exón, primer intrón, segundo exón y parte del segundo intrón, fue elegida para llevar a cabo el clonaje del ADNc de Gαq. (B) Representación esquemática de la región genómica de Gnaq y del diseño de clonaje del ADNc de Gαq wt y EEAA, con los alelos resultantes. El locus de ratón Gnaq aparece representado con sus 7 exones (E) y sus 6 intrones. El exón 1 está delimitado por dos rayas rojas que corresponde a las secuencias que formarán los brazos de homología (hm) donde posteriormente se insertará la construcción del ADNc de Gαq. El BAC seleccionado para llevar a cabo el clonaje, BAC RPCI-23-342P11, que contiene la región de Gnaq comprende los dos primeros exones y sus correspondientes intrones. El exón 1 será sustituido por la construcción genómica que porta el ADNc de Gαq junto con un péptido HA, un codón de parada (STOP), una secuencia poli(A) y un gen de resistencia a ampicilina. Esta construcción que se insertó está flanqueada por los brazos de homología (5'-3' hm) donde tendrá lugar la recombinación homóloga gracias al sistema Counter-Selection BAC Modification Kit. El resultado final tras la recombinación se muestra en el último esquema de la representación gráfica, indicándose las dos construcciones para Gαq wt y Gαq EEAA. (C) Esquema representativo de los productos de PCR y su correcta recombinación. Los productos de PCR representativos muestran la presencia o ausencia de los diferentes fragmentos de ADN insertados. La amplificación fue llevada a cabo con los oligonucleótidos indicados. (D) Análisis Southern blot de los productos de digestión con la enzima de restricción EcoRV de los diferentes BACs. La aparición de las bandas mayoritarias correspondientes se encuentra marcadas con asteriscos y los tamaños relativos de las bandas aparecen indicados.



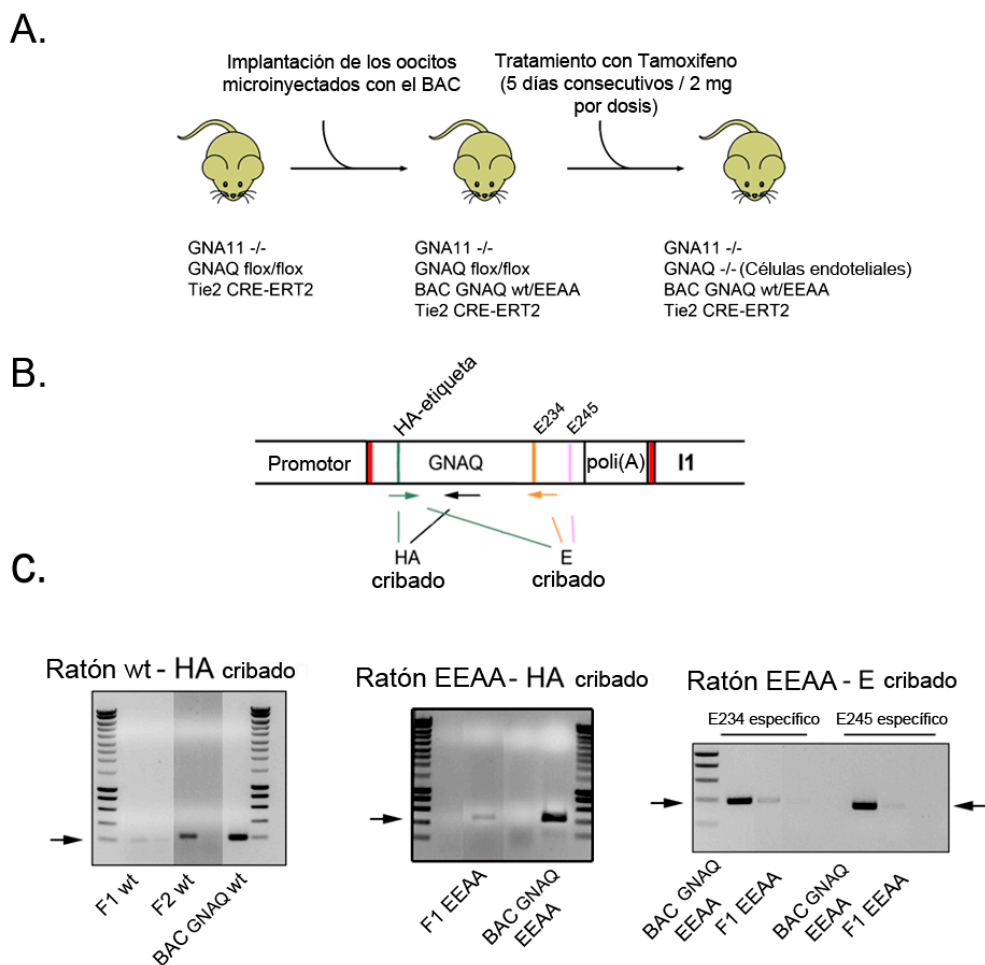
Para poder comprobar si cada uno de los diferentes BACs generados tenían las diferentes mutaciones o la secuencia del péptido etiqueta HA introducidas dentro del ADNc, se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos para poder detectar HA (oligonucleótidos 5'-HA/3'-HA) o la mutación EEAA (oligonucleótidos 5'-HA/3'-E234) (Fig. R2). Se observó que todos los BAC se habían modificado y poseían la secuencia codificante para el péptido HA. Como control de especificidad de la PCR se añadió un BAC de Gnaq mutado en el residuo de lisina 215 (K215E). Además, solo aparecía producto de PCR en el carril del BAC Gnaq EEAA cuando utilizábamos los oligonucleótidos específicos (oligonucleótidos 5'-HA/3'-E234) (Fig. R2B).



**Figura R2. Selección y cribado de los vectores BAC HA-Gnaq wt y BAC HA-Gnaq EEAA.** (A) Representación esquemática de los diferentes BACs. Las secuencias de los brazos de homología (cajas rojas) se encuentran flanqueando las construcciones insertadas en el BAC, que podían contener el péptido HA, la mutación E234/245A (EEAA) o la secuencia wt. Los oligonucleótidos se encuentran señalados como flechas de diferentes colores. En negro aparecen los oligonucleótidos de HA y en naranja E234A. (B) Análisis de la presencia de los mutantes en los productos de PCR obtenidos con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos. Las bandas de interés están indicadas con flechas.

## 1.2. Generación de los ratones transgénicos HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI







Una vez se comprobó que los vectores BAC se habían generado de manera correcta se procedió a la linearización de los mismos mediante la digestión con la enzima de restricción NotI y su posterior purificación usando columnas de Sefarosa (*Sepharose CL-4B*). Estos vectores linearizados fueron inyectados en los pronúcleos de los ratones Gαq f/f; tie2-Cre ER (ratones con fondo genético C57BL/6) (Korhonen et al., 2009) cedidos por el laboratorio del Dr. Offermanns (Fig R3A). Estos ratones son doblemente deficientes en Gαq/Gα<sub>11</sub> en las células endoteliales que expresan una proteína de fusión de la recombinasa Cre con un dominio de unión del receptor de estrógenos (*CreER<sup>T2</sup>*) (Indra et al., 1999) bajo el control del promotor *tie2*. Para controlar los efectos de



**Figura R3. Comprobación de la correcta formación de las líneas de ratones BAC HA-Gnaq wt y BAC HA-Gnaq EEAA.** (A) Diagrama esquemático de las diferentes etapas hasta la obtención de las líneas de ratón transgénicas BAC HA-Gnaq wt y BAC HA-Gnaq EEAA. A partir de la línea transgénica de ratones EC-Gαq /Gα11-KO (Gαq f/f; tie2-Cre ER, G11-/-) se les implantó el oocito previamente inyectado con cada uno de los dos BACs generados. Para la posterior delección de Gnaq en las células endoteliales se les administró un tratamiento de tamoxifeno como se indica en la figura. (B) Representación esquemática de los diferentes BACs. Las secuencias de los brazos de homología (cajas rojas) se encuentran flanqueando las construcciones insertadas en el BAC, que podían contener el péptido HA, la mutación E234A (EEAA) o la secuencia wt. Los oligonucleótidos utilizados se muestran como flechas de diferentes colores: en negro aparecen los oligonucleótidos de HA y en naranja E234/245A. (C) Análisis representativos de PCR confirman la presencia de la secuencia que codifica para el péptido HA y la secuencia específica que codifica para las mutaciones de Gαq EEAA (E234A, E245A) después de la amplificación del ADN genómico de la cola usando los oligonucleótidos específicos. Las bandas de interés están indicadas con flechas.

posicionamiento del lugar de integración del BAC en el genoma, se analizaron 3 líneas fundadoras independientes por alelo. Tras la comprobación del correcto posicionamiento se procedió a evaluar si los ratones expresaban las diferentes formas de HA-Gnaq mediante la extracción de ADN genómico de las colas de esos ratones y realización de una PCR utilizando cuatro combinaciones diferentes de oligonucleótidos para detectar HA (oligonucleótidos 5'-HA/3'-HA), Gnaq EEAA (oligonucleótidos 5'-HA/3'-EEAA), Gnaq E234 (oligonucleótidos 5'-HA/3'-E234) y Gnaq E245 (oligonucleótidos 5'-HA/3'-E245) (Fig. R3B). Mediante el análisis de los productos de PCR se observó que las diferentes líneas de ratones se habían generado correctamente.

En resumen, tras esta serie de comprobaciones realizadas mediante diferentes técnicas de biología molecular, se comprobó que las dos nuevas líneas de ratones (HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI) se habían generado de manera correcta, siendo cada una portadora del transgén que le corresponde. En la tabla R1 se resumen los patrones de expresión esperados de las diferentes proteínas Gαq/11 en cada una de las líneas de ratones, tratados con vehículo o con tamoxifeno.

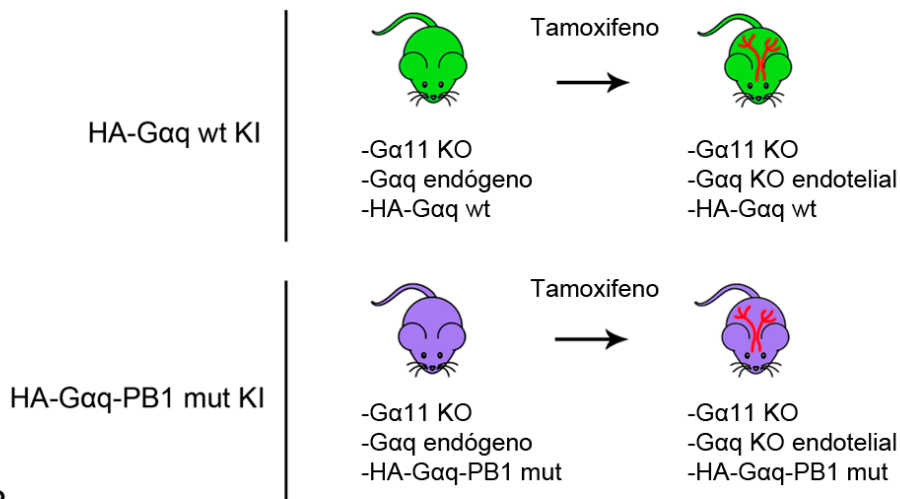
Denominación en figuras	Genotipo	Vehículo	Expresión global	Expresión endotelial	+Tamoxifeno	Expresión global	Expresión endotelial
EC-Gαq KO	EC-Gαq /Ga11-KO		Gαq endógeno Ga11 -/-	Gαq endógeno Ga11 -/-		Gαq endógeno Ga11 -/-	Gαq endógeno -/- Ga11 -/-
HA-Gαq wt KI	BAC HA-Gαq wt		Gαq endógeno Ga11 -/- HA-Gαq wt	Gαq endógeno Ga11 -/- HA-Gαq wt		Gαq endógeno Ga11 -/- HA-Gαq wt	Gαq endógeno -/- Ga11 -/- HA-Gαq wt
HA-Gαq PB1-mut KI	BAC HA-Gαq EEAA		Gαq wt Ga11 -/- HA-Gαq EEAA	Gαq endógeno Ga11 -/- HA-Gαq EEAA		Gαq endógeno Ga11 -/- HA-Gαq EEAA	Gαq endógeno -/- Ga11 -/- HA-Gαq EEAA

**Tabla R1.** Tabla resumen de la expresión esperada de las proteínas Gαq endógena, HA-Gαq wt y HA-Gαq-EEAA en los difentes modelos de ratones transgénicos generados.

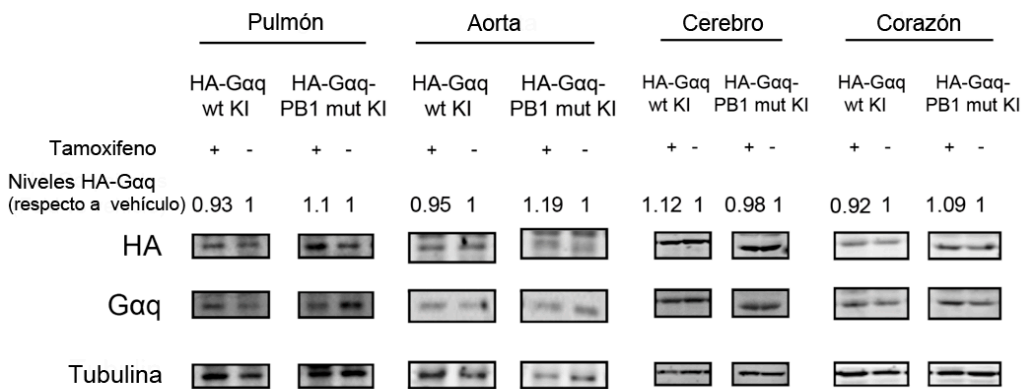
1.3. Análisis de la expresión de HA-Gαq y Gαq endógena en los ratones HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI

Una vez demostrada la correcta inserción del transgén en las diferentes líneas de ratón, se procedió a determinar los niveles de expresión de las diferentes proteínas de interés (HA-Gαq wt, HA-Gαq EEAA y Gαq endógeno) en distintos tejidos. Además, quisimos comprobar si se detectaba una reducción de los niveles de la proteína Gαq endógena endotelial tras el tratamiento de los animales con tamoxifeno (esquema en Fig.R4A).

A.



B.



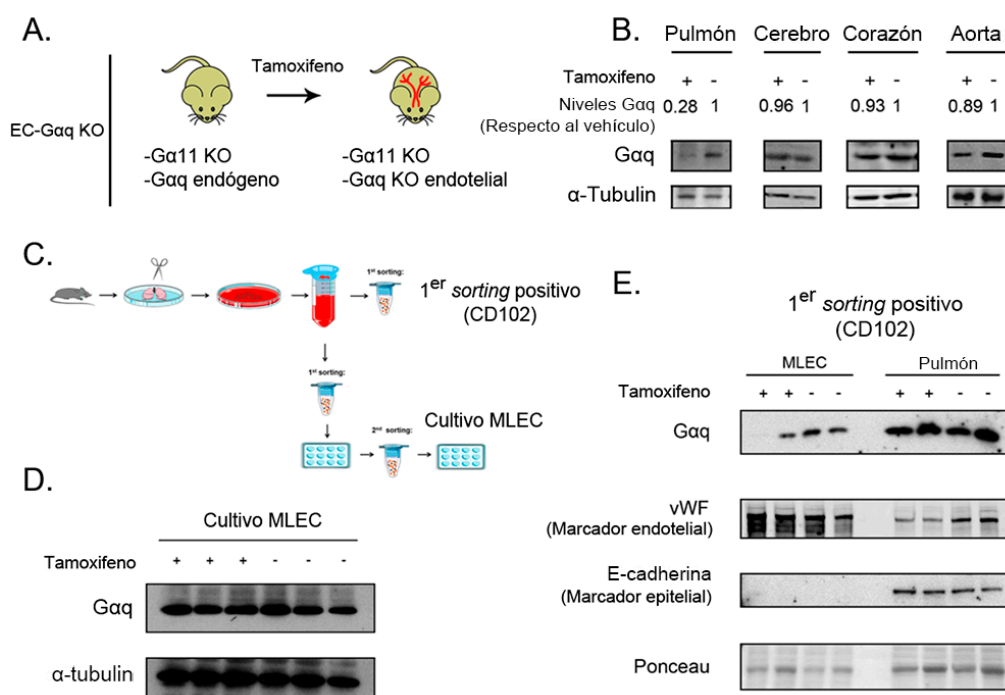
**Figura R4. Análisis de la expresión de HA-Gαq wt y HA-Gαq EEA en distintos tejidos de los ratones transgénicos generados.** (A) Diagrama del diseño experimental. Ratones transgénicos de la línea HA-Gαq wt KI (BAC HA-Gnaq wt, Gαq f/f; tie2-Cre ER, G11-/-) y HA-Gαq PB1 mut KI (BAC HA-Gnaq EEA, Gαq f/f; tie2-Cre ER, G11-/-) fueron tratados con o sin tamoxifeno durante 5 días consecutivos (ver en la sección de Métodos) para eliminar Gαq endotelial. (B) Expresión de la proteína Gαq en ratones tratados o no con tamoxifeno en lisados totales de diferentes tejidos. Los lisados (30μg de proteína/carril) de los tejidos indicados fueron analizados mediante Western Blot utilizando anticuerpos anti-HA (expresión de la proteína Gαq con el péptido etiqueta HA) o anti-Gαq (expresión total de Gαq). En la parte superior del gel se indica la cuantificación relativa respecto del control (tratados con vehículo) de los niveles de HA-Gαq normalizados por los niveles de tubulina, que se utiliza como control de carga de proteína. Se muestra un gel representativo por genotipo y tratamiento.

Con este propósito, se utilizaron lisados procedentes de diferentes órganos como pulmón, aorta, cerebro y corazón de ratones de doce semanas, tratados o no con tamoxifeno (inyección intraperitoneal de 2 mg durante 5 días consecutivos). Mediante análisis por *Western Blot* de los diferentes lisados obtenidos, se determinó la expresión de las proteínas Gαq que contienen el péptido de fusión HA (Fig. R4B). Ambas proteínas, tanto wt como mutante, se expresaban de forma similar en cada uno de los tejidos evaluados (Fig. R4B), coherente con su esperable expresión global. Además, se observó que la expresión de estas dos proteínas, HA-Gαq wt y HA-Gαq EEAA, no se modificaba en los ratones tras el tratamiento con tamoxifeno para promover la delección de Gαq endógeno de las células endoteliales, mientras que los niveles totales de Gαq tampoco se veían alterados (Fig. R4).

#### 1.4. Análisis de la delección de Gαq endógeno en las células endoteliales

Para completar la caracterización de la delección de Gαq en las células endoteliales, se utilizó la línea de ratones que no porta los transgenes de HA-Gαq wt ni HA-Gαq EEAA, que denominamos EC-Gαq KO. Estos ratones EC-Gαq KO, descritos en el laboratorio del Dr. Offermanns, son doblemente deficientes para las proteínas Gαq/Gα<sub>11</sub> en las células endoteliales que expresan la proteína de fusión recombinasa Cre con un dominio de unión del receptor de estrógenos (*CreER<sup>T2</sup>*) (Indra et al., 1999), bajo el control del promotor *tie2*. Este ratón transgénico, en el cual la recombinasa Cre es inducible y específica de endotelio (*tie2-CreER<sup>T2</sup>*), no mostraba ninguna actividad de Cre en ausencia de tamoxifeno cuando se cruzaba con ratones reporteros *Gt* (ROSA) 26<sup>Sor</sup> Cre. Sin embargo, después del tratamiento de los animales con tamoxifeno, las células endoteliales presentaban una elevada recombinación mediada por Cre, indicando que Cre se había activado con gran eficacia, además de ser específica de células endoteliales (Korhonen et al., 2009).

Para analizar la expresión de Gαq endógeno en animales a los que se les administró tamoxifeno frente a los que se les administró vehículo (Fig. R5A), se utilizaron lisados de tejidos que presentan una elevada vascularización, como son pulmón, cerebro, corazón y aorta. Se observó una clara reducción de Gαq (aproximadamente del 70%) en los lisados obtenidos a partir de pulmón de ratones de 12 meses tratados con tamoxifeno, mientras que en el resto de los tejidos analizados la reducción no fue tan evidente, probablemente debido a que se trata de lisados del tejido completo (Fig. R5B).



**Figura R5. Estudio de la delección de Gαq endotelial en ratones EC-Gαq /Gα11-KO.** (A) Diagrama del diseño experimental. Ratones transgénicos de la línea EC-Gαq KO fueron tratados con o sin tamoxifeno durante 5 días consecutivos (ver sección de Métodos) para eliminar Gαq endotelial. (B) Expresión de la proteína Gαq en ratones tratados o no con tamoxifeno en diferentes tejidos. Los lisados (30μg de proteína/carril) de los tejidos indicados fueron analizados mediante Western Blot. Se indican en la parte superior los niveles relativos de Gαq normalizados por los niveles de α-tubulina, que fue utilizada como control de carga. Se muestra un gel representativo. (C) Diagrama del diseño experimental de la obtención de células endoteliales de pulmón de ratón (ver Métodos) modificado de (Wang, Niu, Xu, & Jin, 2019). (D) La expresión de Gαq se analizó mediante Western Blot en lisados de MLEC obtenidas de ratones de la línea transgénica EC-Gαq /Gα11-KO tratados con o sin tamoxifeno y mantenidas en cultivo. Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra tubulina. Se muestra un gel representativo. (E) Niveles de expresión de Gαq en células endoteliales de pulmón (MLECs) y en lisados totales de pulmón de ratones tratados o no con tamoxifeno. Los extractos celulares de las células MLEC fueron obtenidos de una fracción enriquecida procedente de la primera selección positiva (más detallado en Métodos). Para comprobar el enriquecimiento de las fracciones endoteliales se utilizó como marcador de endotelio la proteína vWF (von Willebrand Factor) y la ausencia de un marcador de células epiteliales como es la proteína E-cadherina. En el caso de los lisados totales de pulmón al ser una mezcla de diferentes tipos celulares se detectan ambos marcadores, pero la cantidad relativa de vWF se presenta reducida. Como control de carga se muestra la tinción de la membrana con el colorante rojo de Ponceau.

A continuación, quisimos confirmar los datos obtenidos en pulmón mediante el aislamiento de células endoteliales de este tejido mediante un protocolo bien establecido de obtención de células endoteliales de la microvasculatura del pulmón de ratón (células

MLEC, del inglés “Mouse Lung Endothelial Cells”) (Fig. R5C). Estas células fueron aisladas a partir del pulmón de ratones EC-Gαq KO, tratados con tamoxifeno o vehículo a las 12 semanas de su nacimiento. Transcurridas dos semanas después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados para obtener los cultivos de células MLEC. Como se puede observar en la figura R5D, las células MLEC en cultivo no presentaron diferencias en los niveles totales de la proteína Gαq tras el tratamiento con tamoxifeno *in vivo*. Sin embargo, cuando los niveles de Gαq se analizaron en una fracción enriquecida en MLECs al inicio de su proceso de aislamiento (primer “*sorting*”) en vez de en el cultivo de MLECs ya establecido (Pase 3), observamos que los niveles de la proteína Gαq se reducían tras el tratamiento con tamoxifeno (Fig. R5E).

Este resultado sugiere que durante el establecimiento del cultivo de MLECs se produce una selección negativa de las células que no poseen Gαq frente a las que expresan la proteína. En todo caso, teniendo en cuenta nuestros datos *in vivo* (Fig. R5B) y la caracterización previa de este modelo (Indra et al., 1999), y que no existían diferencias en los niveles de expresión de las proteínas HA-Gαq wt y HA-Gαq EEAA en los animales transgénicos generados tras el tratamiento con tamoxifeno (Fig R4B), consideramos que estos modelos eran adecuados para llevar a cabo ensayos *in vivo* para poder caracterizar de manera más efectiva el papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la función vascular.

## 2. Caracterización del papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la función vascular

La pared de los vasos sanguíneos es una barrera para los fluidos, solutos y las células que circulan a través del sistema vascular. Esta barrera principalmente está formada por las células endoteliales, que cubren la superficie interna de los vasos sanguíneos. Una característica importante de esta barrera vascular radica en que no es totalmente hermética, sino que es capaz de regular el transporte de solutos y células al interior del espacio extracelular mediante un proceso denominado extravasación (Wettschureck et al., 2019). Tal como se ha mencionado anteriormente las proteínas G heterotriméricas, en concreto Gαq/11, juegan un papel muy importante en la regulación del funcionamiento de la barrera endotelial. A su vez, las proteínas con dominios PB1 están también implicadas en el correcto funcionamiento endotelial (Burke & Berk, 2015). Uno de los objetivos que nos planteamos en este trabajo fue determinar cómo podría afectar la mutación de residuos específicos en una región de Gαq, implicada en la unión a proteínas con dominios PB1 (Gαq-EEAA), en la función endotelial de



los vasos sanguíneos, ya que disminuye marcadamente su capacidad de interactuar con estas proteínas. Para ello, utilizamos las *líneas* de ratones transgénicos descritas anteriormente donde podemos recuperar la expresión de las proteínas HA-Gαq wt o HA-Gαq-EEAA en las células endoteliales una vez se consigue la delección de la proteína Gαq endógena, tras el tratamiento con tamoxifeno.

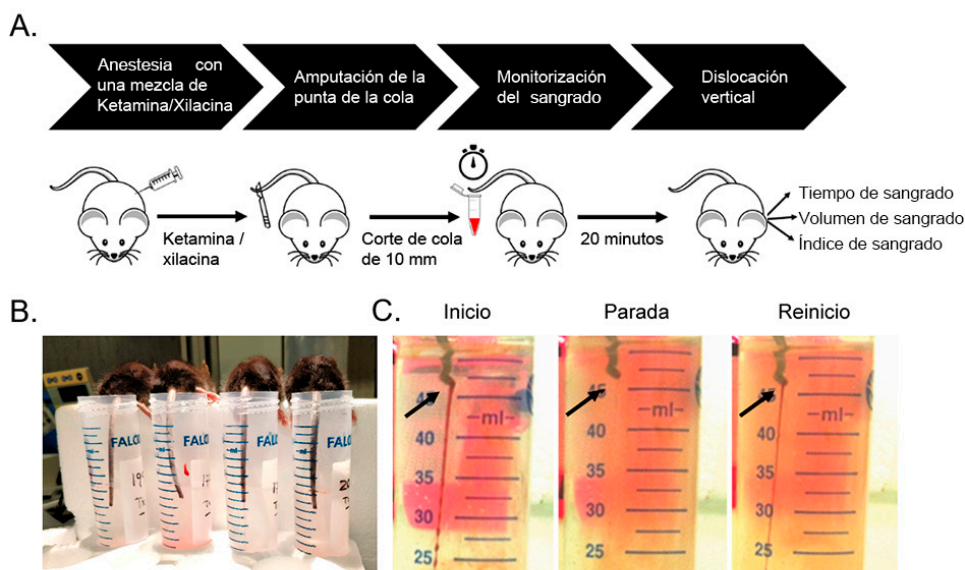
## 2.1. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la hemostasis vascular

Es interesante destacar que las células endoteliales tienen una elevada expresión de receptores activados por proteasas que pertenecen a la familia de los GPCRs, en concreto los receptores PAR-1 y PAR-2, que señalizan a través de proteínas Gαq. La activación de estos receptores mediante ligandos como la trombina, que activa al receptor PAR-1, provoca la liberación de factores coagulantes y fibrinolíticos derivados del endotelio que induce, a su vez, la movilización del factor VonWillebrand (vWF) y P-Selectina de los cuerpos de Weibel-Palade. La secreción de estos factores va a promover el rodamiento y posterior adhesión a la superficie endotelial de las plaquetas y leucocitos (Alberelli & De Candia, 2014; Rusu et al., 2014; Li et al., 2020). Además, es importante destacar que Gαq/11 tienen un papel esencial en la activación de las plaquetas, detectándose una reducción en la formación de trombos vasculares en los ratones Gαq/11 KO (Offermanns et al., 1997).

Para analizar el papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la hemostasis vascular, se llevó a cabo un ensayo de sangrado en las diferentes líneas de ratones generadas (EC-Gαq KO, HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI). A cada uno de los genotipos de ratones se le administró vehículo o tamoxifeno dos semanas antes de realizar el ensayo, tal como se detalla en la sección de Métodos. Este ensayo permite evaluar la integridad de los vasos, la funcionalidad de las plaquetas *y la formación del coágulo* mediante la determinación tanto del volumen como del tiempo de sangrado y el cálculo del coeficiente entre ambos, conocido como *bleeding index* (Liu, 2012). Además, mediante este ensayo se puede detectar la existencia de patrones de parada y reinicio del sangrado (re-sangrado o *re-bleeding*) (Fig. R6C). En primer lugar, nuestros resultados muestran que la pérdida de Gαq endotelial en los ratones EC-Gαq KO tras la administración de tamoxifeno indujo un incremento significativo en el tiempo, volumen e *índice de sangrado respecto a los ratones control* (EC-Gαq KO tratados con vehículo) (Fig. R7B). Sin embargo, no se observaron cambios en estos tres parámetros tras la administración de tamoxifeno entre los ratones control y los animales HA-Gαq



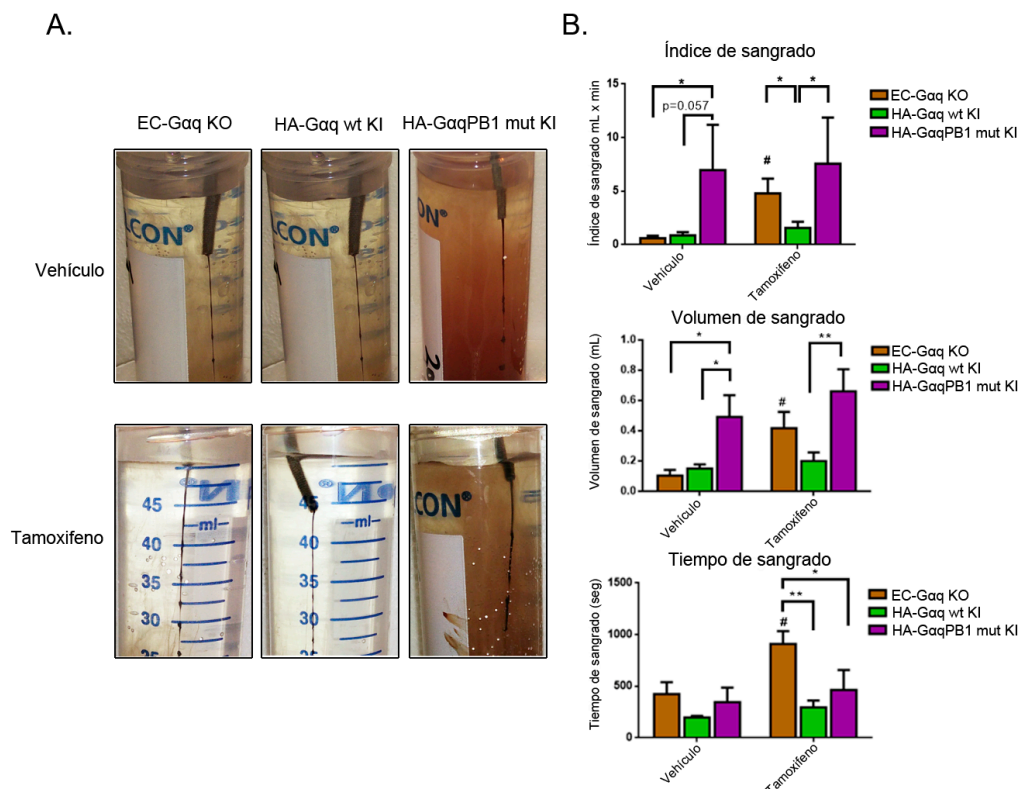
wt KI (Fig. R7B), capaces de mantener en esas circunstancias, como se he comentado anteriormente, la expresión de HA-Gαq wt en endotelio.



**Figura R6. Descripción del ensayo de sangrado.** (A) Esquema del diseño experimental del ensayo de sangrado, Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina y se les realizó una amputación de la cola sumergiéndola a continuación en suero salino a 37°C durante 20 minutos. Se monitorizaron los tiempos de sangrado (segundos), volúmenes de sangrado (ml) y el índice de sangrado (ml x minuto). (B) En la imagen se muestra la disposición de los ratones en el ensayo de sangrado. (C) En la imagen se muestran (marcado con flechas) los ciclos de comienzo, parada y reinicio de sangrado, proceso este último que solo se observó en los animales en los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI, modificada de (Liu, 2012).

De forma interesante, los ratones HA-Gαq-PB1 KI, presentaron un índice y volumen de sangrado significativamente más elevados que los otros dos genotipos incluso en las condiciones de tratamiento con el vehículo. Estos resultados indican que la simple expresión en endotelio de la proteína Gαq mutada en la región de interacción con proteínas con dominios PB1 induce un notable incremento de sangrado (Fig. R7B), a pesar de estar presente la proteína Gαq endógena. Además, la expresión endotelial de HA-Gαq mutada (HA-Gαq-EEAA), no consiguió recuperar los parámetros de sangrado en los ratones sin Gαq endotelial tras tratamiento con tamoxifeno, tal como sí observamos que ocurría en los que expresaban HA-Gαq wt (Fig. R7B). Cabe destacar, además, que los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI presentaban un patrón de *re-bleeding* (parada y resangrado) que no se observó en ninguno de los otros genotipos (datos no mostrados). Este patrón de *re-bleeding*, es un fenómeno común cuando la acción

hemostática de las plaquetas está parcialmente inhibida, lo que produce una estructura inestable y una mala adhesión del trombo a la pared del vaso que se puede retirar con el flujo sanguíneo arterial (André et al., 2003; Liu et al., 2012).



**Figura R7. Medida del tiempo y volumen de sangrado en los diferentes genotipos de ratones generados.** (A) En la imagen se muestran ejemplos de las diferencias en el sangrado de las diferentes líneas de ratones EC-Gαq KO, HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI, a las que se les administró tamoxifeno o vehículo. (B) Cuantificación de los tiempos de sangrado, volumen de sangrado e índice de sangrado en las distintas condiciones experimentales. Los datos representan la media  $\pm$  SEM ( $n=12$  por genotipo). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante two-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$  para las comparaciones indicadas, # $p<0.05$  vehículo vs tamoxifeno.

En resumen, nuestros datos muestran que en los ratones EC-Gαq KO los niveles de sangrado aumentan cuando se reducen los niveles de la proteína Gαq endotelial como ya fue descrito por el laboratorio del Dr. Offermanns (Offermanns et al., 1997). Este fenotipo, inducido por el tratamiento con tamoxifeno, se previene en los ratones knock-in que expresan la proteína HA-Gαq wt. Por último, de forma sorprendente, hemos observado que la expresión de HA-Gαq mutado en el dominio PB1 incrementa de forma basal el sangrado de los ratones, tanto en presencia de Gαq endotelial endógena,

como en su ausencia. Estos resultados plantean un posible efecto como dominante negativo de la proteína  $G\alpha_q$  incapaz de interactuar con proteínas con dominios PB1 sobre la función de la proteína  $G\alpha_q$  endógena. Es importante tener en cuenta que este efecto podría ser debido tanto a la alteración en la actividad plaquetaria como de las propias células endoteliales, ya que los ratones HA- $G\alpha_q$ -PB1 mut KI expresan esta proteína de forma global en los diversos tipos celulares.

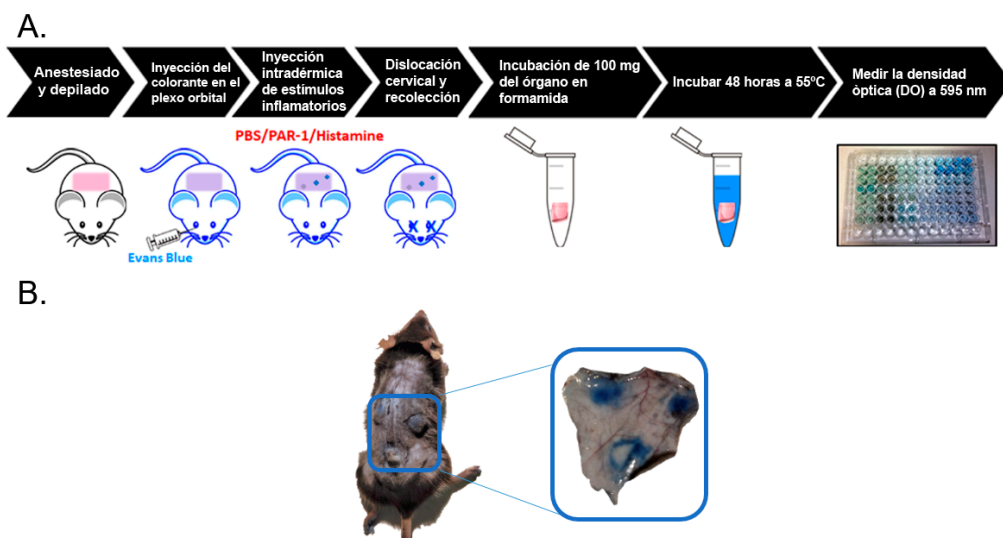
## 2.2. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de $G\alpha_q$ en la permeabilidad vascular

La barrera endotelial microvascular se regula de manera dinámica para poder permitir el transporte adecuado de fluidos y solutos. Esta permeabilidad vascular puede estar incrementada por numerosos factores, como pueden ser VEGF y numerosos mediadores inflamatorios como son histamina, bradiquinina, factor activador de plaquetas (PAF) y trombina, que son los estímulos más estudiados. Las vías de señalización de muchos de estos estímulos están asociadas a proteínas  $G\alpha_q/11$  (Wettschureck et al., 2019).

Para poder profundizar en el papel de la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha_q$  en la permeabilidad endotelial, llevamos a cabo un ensayo *in vivo*, conocido como ensayo de *Miles*. Este ensayo consiste en la inyección a través del plexo orbital de colorante azul de Evans, el cual se unirá a la albúmina en circulación. A continuación, en las regiones del lomo rasurado del ratón se inyectan de manera intradérmica diferentes compuestos que promueven la apertura de la barrera endotelial y se procede a determinar la extravasación del colorante (Fig. R8, ver detalles en la sección de Métodos).

En el laboratorio del Dr. Offermanns ya se había descrito previamente que los ratones EC- $G\alpha_q$  KO, sin  $G\alpha_q$  endotelial tras el tratamiento con tamoxifeno, presentaban una reducción brusca de la permeabilidad vascular al ser expuestos a sustancias vasoactivas (PAR-1/trombina o histamina) (Sivaraj et al., 2015). Efectivamente, nuestros resultados mostraron que estos ratones EC- $G\alpha_q$  KO presentaban en el ensayo de Miles una reducción aproximada del 70% de la extravasación del colorante en respuesta al ligando de PAR-1 o de histamina, comparado con los ratones que sí presentaban  $G\alpha_q$  endotelial (Fig. R9A). Al eliminar  $G\alpha_q$  endógena en el endotelio de los ratones knock-in que expresaban la proteína *wild type* (HA- $G\alpha_q$  wt KI) este fenotipo de falta de respuesta a estímulos se previene (Fig. R9B). Así, se observa claramente que los ratones HA- $G\alpha_q$  wt KI tratados con tamoxifeno no presentaban diferencias significativas en la permeabilidad vascular en respuesta al péptido de PAR-1 o histamina respecto a los

tratados con vehículo, a diferencia de lo que ocurre en los ratones EC-Gαq KO en esas condiciones. Estos datos indican que los ratones HA-Gαq wt KI mantienen su capacidad de respuesta aun en condiciones de delección de Gαq endógena (Fig. R9E), rescatando el fenotipo de los ratones EC-Gαq KO de forma similar a lo que detectamos en los ensayos de sangrado.



**Figura R8. Diseño experimental del ensayo de permeabilidad de Miles.** (A) Diagrama del diseño experimental del ensayo de permeabilidad vascular, ensayo de Miles (ver sección de Métodos). (B) Imagen de un ratón tras la inyección del colorante azul de Evans en el plexo orbital y la inyección intradérmica en el lomo del ratón de los diferentes compuestos promotores de la permeabilidad endotelial.

Por el contrario, los ratones HA-Gαq-PB1-mut KI no son capaces de mantener una respuesta adecuada al péptido de PAR-1 o a histamina en condiciones de eliminación de Gαq endógena con tamoxifeno (Fig. R9C), mostrando un patrón similar al observado en animales EC-Gαq KO. La cuantificación de la extravasación del colorante obtenida tras los ensayos revela que los ratones que expresan HA-Gαq-PB1-mut KI presentan una reducción próxima al 35% (péptido activador PAR-1) o al 30% (histamina) comparado con los ratones EC-Gαq KO o los ratones HA-Gαq wt KI incluso en ausencia de tratamiento con tamoxifeno, mientras que tras este tratamiento presentan una funcionalidad endotelial comprometida similar a la medida en animales EC-Gαq KO sin Gαq endógena (Fig. R9E).

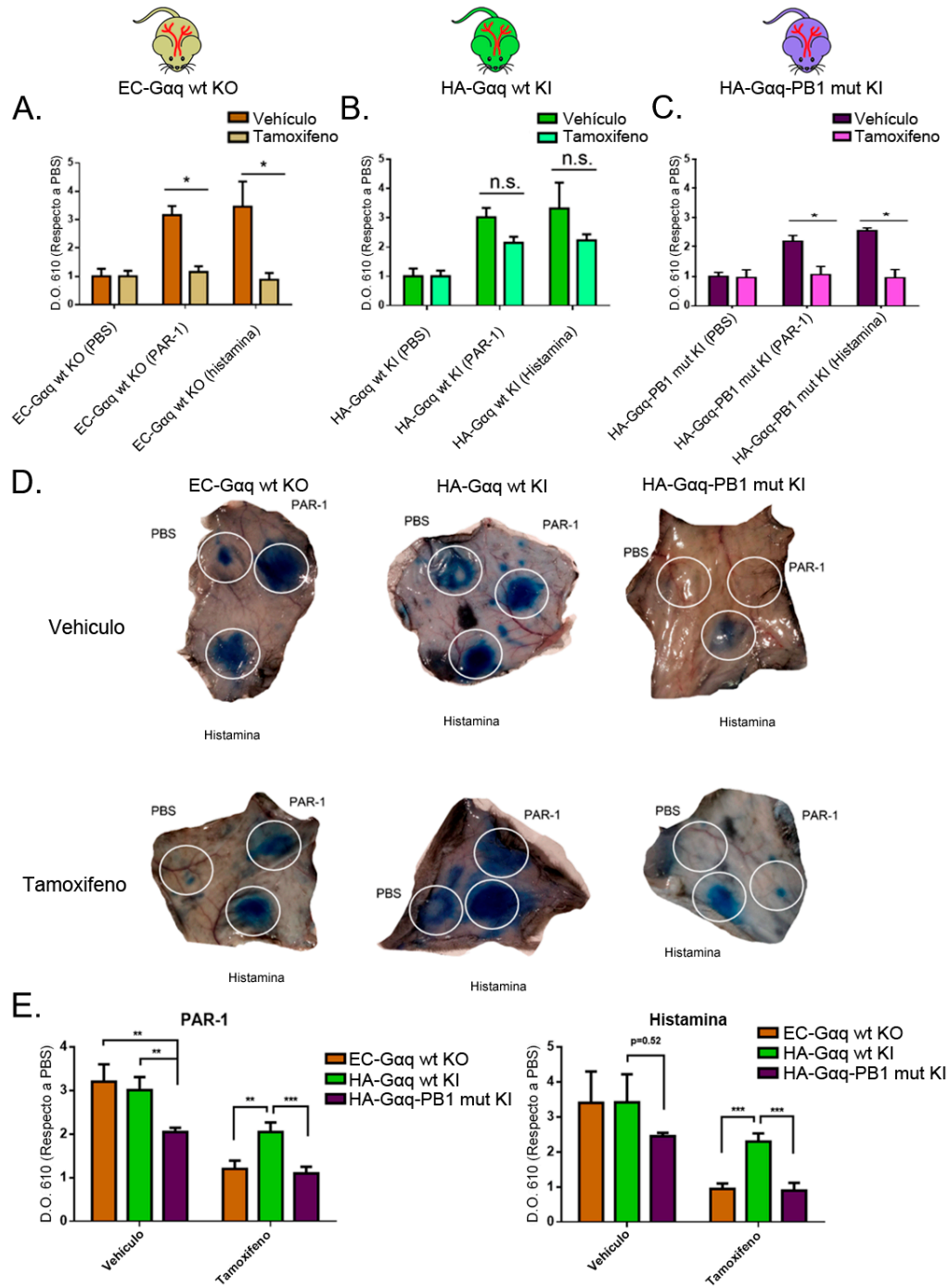


Figura R9. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en la permeabilidad vascular.

Niveles de extravasación del colorante azul de Evans a la piel del flanco dorsal de ratones EC-Gαq KO (A), HA-Gαq wt KI (B) y HA-Gαq-PB1 mut KI (C) que fueron tratados con o sin tamoxifeno. A cada uno de los ratones se les administró una inyección intradérmica de 50 μl de PBS, péptido PAR-1 o histamina. Los datos se representaron como la media ± SEM de n=4 animales por grupo. La significancia estadística fue analizada utilizando mediante two-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.05, n.s., no significativo. (D) Se muestran imágenes representativas de la extravasación del colorante azul de Evans a la piel del flanco dorsal de ratones EC-Gαq KO, HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI de los experimentos representados en los paneles anteriores. (E) Representación alternativa de los datos mostrados en los paneles A-C para comparar la capacidad de respuesta a los estímulos en las distintas condiciones experimentales. La significancia estadística fue analizada utilizando two-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \*p<0.05, \*\*p<0.005, p<0.001.

En resumen, los datos muestran que los ratones sin Gαq endotelial presentan una reducción drástica de la respuesta a agentes promotores de la permeabilidad vascular. Este fenotipo se revierte al expresar en este tipo celular la proteína HA-Gαq wt, pero no la proteína HA-Gαq mutada en el dominio PB1. Además, la expresión de esta proteína HA-Gαq mutada induce *per se* una moderada reducción de la permeabilidad inducida por histamina y el péptido activador de PAR-1 incluso en situación control (tratamiento con vehículo). Todo ello sugiere un papel relevante de la región interactora de Gαq con proteínas que presentan dominios PB1 en la modulación de la permeabilidad inducida por ligandos asociados a GPCRs acoplados a Gαq/11.

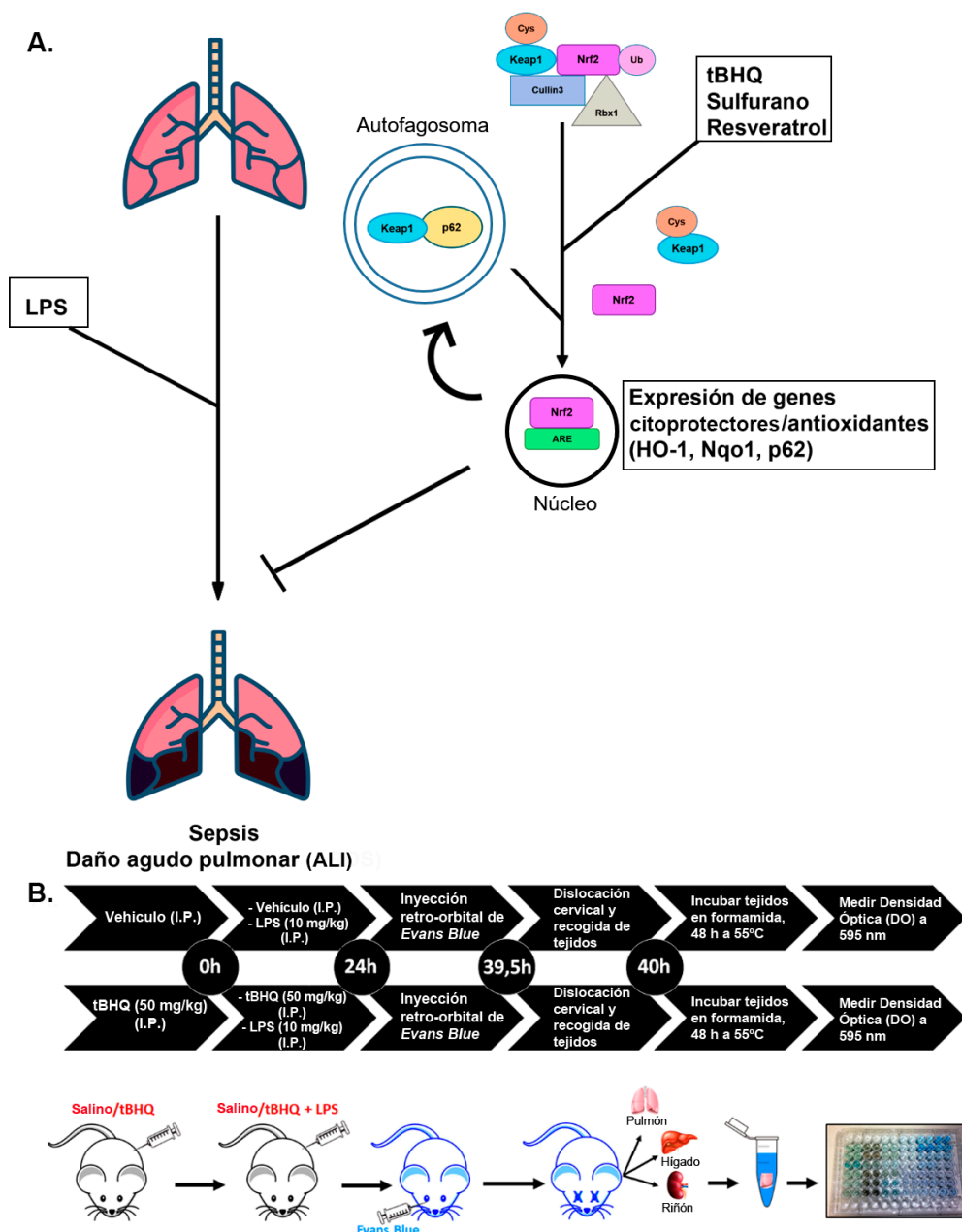
#### 2.4. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en modelos de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS

El síndrome de disfunción orgánica múltiple es una de las complicaciones más devastadoras de la sepsis, y uno de los primeros órganos que se ven afectados son los pulmones, en los que se provoca lo que se conoce como daño pulmonar agudo (ALI, del inglés “Acute Lung Injury”). En sepsis, uno de los estímulos iniciadores de esta inflamación sistémica es el componente bacteriano lipopolisacárido (LPS), que induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang et al., 2014). Cabe destacar que cuando se produce un proceso de sepsis las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar sufren un incremento de la apoptosis que produce una disfunción de la barrera endotelial, provocando edema pulmonar (Gill, Rohan, & Mehta, 2015). Esta disfunción del endotelio provoca un



fenotipo pro-trombótico, que está involucrado en el fallo orgánico múltiple (Schouten et al., 2008; Gill et al., 2015). Se ha descrito que compuestos activadores de las respuestas antioxidantes, como la terbutilhidroquinona (tBHQ), provocan la activación de la vía de señalización del factor Nrf2, que protege frente al daño agudo pulmonar producido por LPS (Wei et al., 2018). Además, en los últimos años se han descrito mecanismos de protección frente al daño agudo pulmonar producidos por la activación de la autofagia en las células endoteliales (Dong et al., 2018; Zhang et al., 2018). Dado el papel de receptores acoplados a  $G\alpha_q$  en la regulación de la permeabilidad vascular o en la respuesta inflamatoria (Wettschureck et al., 2019; Brojakowska, Narula, Shimony, & Bander, 2020), quisimos explorar el papel que podría jugar la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha_q$  en la disfunción del endotelio inducido por LPS, utilizando un ensayo *in vivo* de daño pulmonar inducido por LPS (Fig. R10).

En primer lugar, con el objetivo de inducir sepsis se les administró, a todos los grupos de animales, LPS por vía intraperitoneal. Posteriormente, tras la inyección de colorante azul de Evans a través del plexo orbital, se determinó su extravasación en pulmón, riñón e hígado como indicador de disfunción de la barrera endotelial y subsiguiente edema. Como control positivo de la reducción de los efectos del LPS mediados por la activación de la respuesta antioxidante a través de Nrf2, se utilizó el compuesto terbutilhidroquinona (tBHQ) (Wei et al., 2018). Nuestros resultados no evidenciaron diferencias en la extravasación del colorante azul de Evans inducida por LPS en el hígado o en el riñón de los tres genotipos de ratones (EC- $G\alpha_q$  KO, HA- $G\alpha_q$  wt KI o HA- $G\alpha_q$ -PB1-mut KI), con o sin  $G\alpha_q$  endotelial endógena tras tratamiento con tamoxifeno (Fig. R11). Sin embargo, la extravasación de colorante en los pulmones de los ratones EC- $G\alpha_q$  KO sin  $G\alpha_q$  endotelial (tratados con tamoxifeno) mostró una clara y significativa reducción del 60% respecto a los ratones con  $G\alpha_q$  endógena presente en el endotelio. Esta reducción de la extravasación fue similar a la que se observó cuando los ratones con  $G\alpha_q$  endotelial (vehículo) fueron tratados con tBHQ (Fig. R11A). Estos datos sugerían que  $G\alpha_q$  endotelial desempeña un papel relevante en la producción de edema pulmonar mediado por LPS. En este sentido, el tratamiento de ratones EC- $G\alpha_q$  KO/tamoxifeno con el compuesto tBHQ indujo aún mayor reducción significativa de la extravasación (cercana al 50%) sugiriendo que  $G\alpha_q$  sigue teniendo un papel promotor del edema en esas condiciones experimentales (Fig. R11A).



**Figura R10. Modelo y diseño experimental del ensayo de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS.** (A) El tratamiento de los ratones con LPS provoca la aparición de síntomas de sepsis y daño agudo pulmonar. La activación de la respuesta antioxidante que media Nrf2 reduce los efectos del LPS. Compuestos como tertbutilhidroquinona (tBHQ), resveratrol, sulforano o la inducción de autofagia favorecen esta respuesta. (B) Diagrama del diseño experimental del modelo de sepsis y daño pulmonar inducido por LPS (ver detalles en la sección de Métodos).

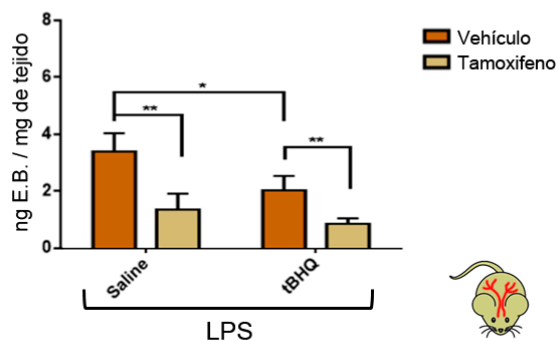


Al analizar la disfunción vascular inducida por LPS en los pulmones de los animales que expresaban HA-Gαq wt (HA-Gαq wt KI), se observó que la expresión “extra” de Gαq en los animales knock-in en condiciones de no eliminación de la proteína endógena (LPS+ vehículo) daba lugar a una mayor extravasación que en los animales control (Fig. R11B y R12A), coherente de nuevo con un papel facilitador de Gαq en la producción de edema pulmonar por LPS. La eliminación de Gαq endógena en estos animales (LPS+ tamoxifeno) redujo la extravasación del colorante (aprox. un 40%) (Fig. R11B), aunque no tanto como en los animales EC-Gαq KO (Fig. R12A), probablemente debido a la permanencia del componente *knock-in* de HA-Gαq wt en el endotelio en estas condiciones.

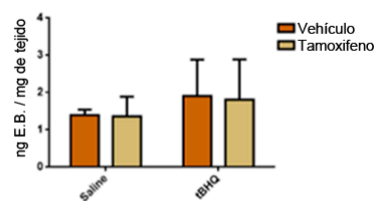
En lo que respecta a los ratones HA-Gαq-PB1-mut KI, es de destacar que en condiciones de no eliminación de la proteína endógena (LPS + vehículo) estos animales presentan una extravasación significativamente menor que los animales EC-Gαq KO o HA-Gαq wt KI (Fig. R11C y R12A), siendo esos menores niveles comparables con los de los animales EC-Gαq KO tras delección de Gαq endógena (Fig. R11C y R12). Los niveles de edema en ratones HA-Gαq-PB1-mut KI no disminuyen tras la eliminación de Gαq endógena (LPS + tamoxifeno) (Fig. R11C). Además, el tratamiento con tBHQ en estos ratones *knock-in* con Gαq mutante (HA-Gαq-PB1-mut KI) no provocó ningún cambio añadido en los niveles de extravasación del colorante en los pulmones de estos animales, manteniéndose los mismos niveles reducidos con o sin tratamiento (Fig. R11C).

En conjunto, estos datos sugieren que Gαq endotelial tiene un papel relevante en la producción de daño pulmonar en respuesta a LPS a través de mecanismos que incluyen su interacción con proteínas con dominios PB1, ya que la proteína mutante HA-Gαq-PB1-mut no es capaz de promover esa respuesta. Por otra parte, el hecho de que ratones *knock-in* con este Gαq mutante presente una reducción de la extravasación en condiciones de LPS+vehículo, que además no es afectada por el tratamiento con tBHQ sugiere que HA-Gαq-PB1-mut tiene un papel como dominante negativo sobre la función de la proteína Gαq endógena y algún tipo de relación moduladora con la vía tBHQ/Nrf2.

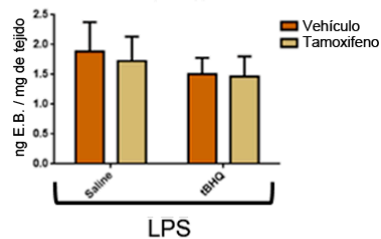
## A. EC-Gaq KO (Pulmón)



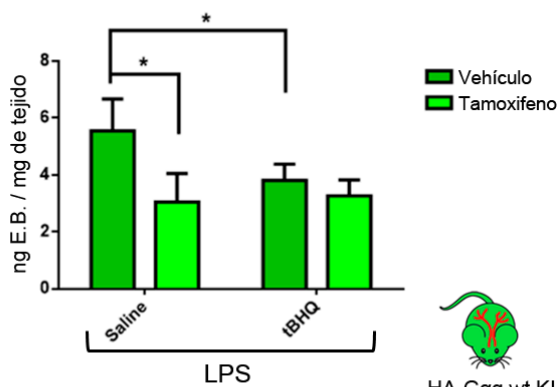
## EC-Gaq KO (Hígado)



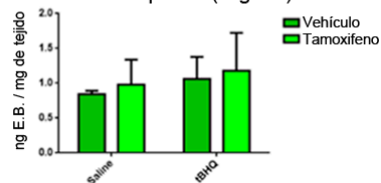
## EC-Gaq KO (Riñón)



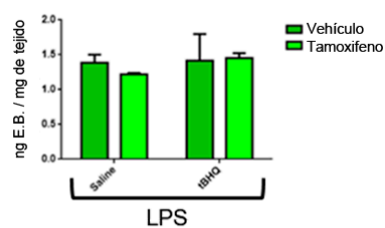
## B. HA-Gaq wt KI (Pulmón)



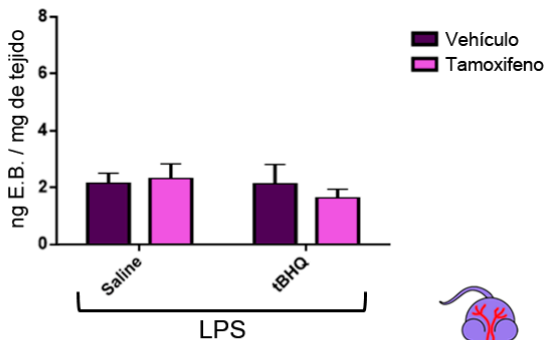
## HA-Gaq wt KI (Hígado)



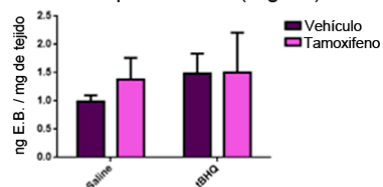
## HA-Gaq wt KI (Riñón)



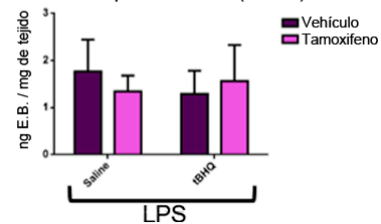
## C. HA-Gaq-PB1 mut KI (Pulmón)



## HA-Gaq-PB1 mut KI (Hígado)

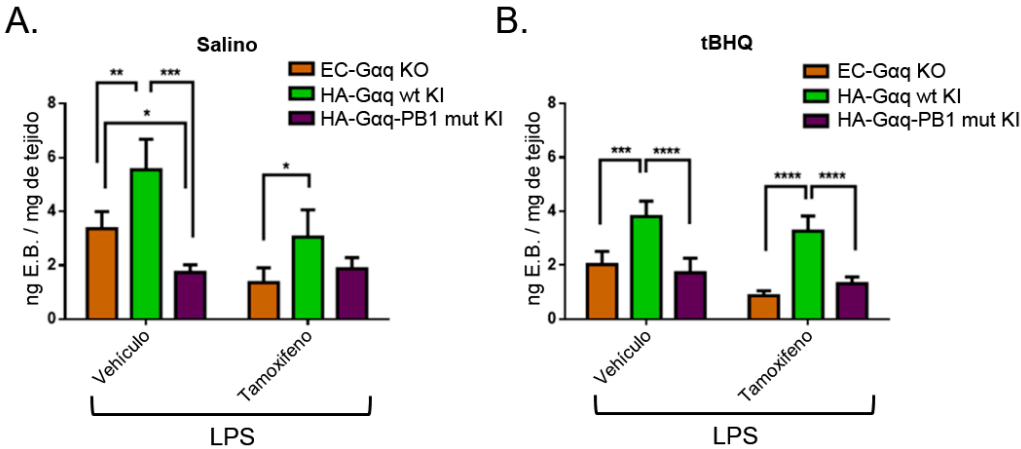


## HA-Gaq-PB1 mut KI (Riñón)



**Figura R11. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha q$  en el modelo de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS.** (A) Cuantificación de la extravasación del colorante azul de Evans en los pulmones, hígado y riñón de los ratones transgénicos EC- $G\alpha q$  KO (A), HA- $G\alpha q$  wt KI (B) y HA- $G\alpha q$ -PB1 mut KI (C), tratados con vehículo o con tamoxifeno. Para inducir el proceso de sepsis todos los ratones fueron tratados con LPS (10 mg/kg) ( $n=4$  por grupo), y como control de la reducción del efecto del LPS se utilizó tBHQ (50 mg/kg) en un grupo experimental paralelo ( $n=4$  por grupo). Entre 50-100 mg de tejido fueron incubados con 200  $\mu$ l de formamida para la extracción del colorante azul de Evans. Posteriormente se determinó la densidad óptica (610 nm) de las muestras y las medidas fueron convertidas a ng de colorante extravasado por mg de tejido. Los datos obtenidos se representaron como la media  $\pm$  SEM de 4 animales por grupo. La significancia estadística fue analizada mediante two-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

En la tabla R2, se muestra un resumen de los diferentes fenotipos vasculares que se han descrito para las diferentes líneas de ratones transgénicos generadas en este trabajo.



**Figura R12. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha q$  en el modelo de sepsis generado tras la administración de LPS.** (A) Los datos de la extravasación del colorante azul de Evans en los pulmones de los ratones de las líneas EC- $G\alpha q$  KO, HA- $G\alpha q$  wt KI y HA- $G\alpha q$ -PB1 mut KI obtenidos en las condiciones descritas en la Figura R11 se representan de manera conjunta para analizar las diferencias fenotípicas de las distintas líneas de ratones en respuesta a LPS en presencia (vehículo) o ausencia (tamoxifeno) de  $G\alpha q$  endógena (panel A), así como el efecto en los distintos contextos del agente protector tBHQ. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 4 animales por grupo. La significancia estadística fue analizada mediante two-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Newman-Keuls. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

	EC-Gαq KO		HA-Gαq wt KI		HA-Gαq-PB1 mut KI	
Tratamiento tamoxifeno	-	+	-	+	-	+
Fenotipo de <i>Bleeding</i>	=	^	=	=	^^	^^
Permeabilidad vascular	=	v	=	=	v	v
<i>Vascular leakage</i> inducida por sepsis	=	vv	^	=	vv	vv

**Tabla R2. Resumen de los fenotipos vasculares analizados en las diferentes líneas transgénicas de ratones.** Las puntas de fechas orientadas hacia la parte superior indican incremento y las puntas de fecha en dirección inferior disminución, respecto al símbolo de igual que representa los niveles de los animales EC-Gαq KO sin tratamiento con tamoxifeno.

2.5. Otros fenotipos

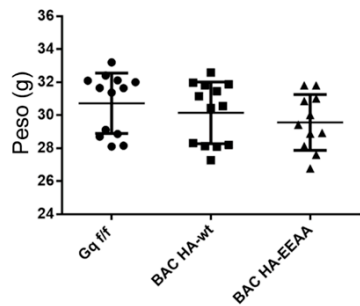
Como complemento al estudio fenotípico de la función endotelial abordado en los apartados anteriores, se reflejan en este apartado otras particularidades fenotípicas que han llamado nuestra atención durante el desarrollo de las líneas transgénicas EC-Gαq KO, HA-Gαq wt KI y HA-Gαq-PB1 mut KI, por si más adelante pueden ayudar a entender el impacto fisiopatológico de esta proteína.

2.5.1. Los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI presentan alteraciones en los patrones de fertilidad

De forma general, no se encontraron diferencias significativas en el peso determinado a los 90 días de vida, entre los distintos genotipos (Fig.R13A). Al registrar los patrones de reproducción de los distintos genotipos, se constató que no existían diferencias en el porcentaje de machos frente a hembras en los partos entre las tres líneas de ratones. Sin embargo, cuando se determinó el número de crías nacidas por parto se observó que existía una reducción significativa del 40% en el número de nacimientos de las hembras HA-Gαq-PB1 mut KI frente a los de las hembras EC-Gαq KO o HA-Gαq WT KI (Fig. R13B). Además, para conocer si también existía una diferencia entre el número de partos entre los distintos genotipos, se mantuvieron 5 cruces simultáneos durante un

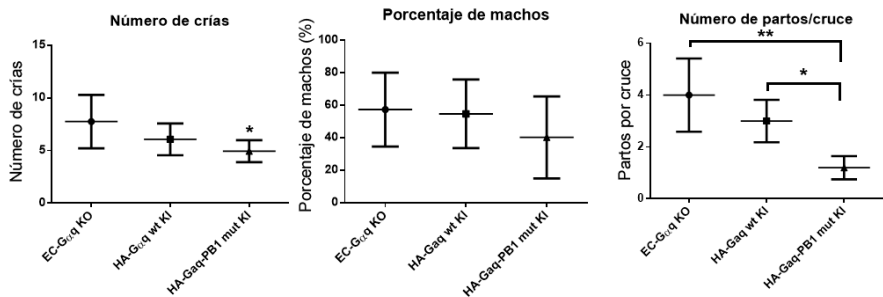
tiempo mínimo de 5 meses y se observó el número de partos que se generaban por línea de ratón. El análisis del número de partos por cruce mostró que mientras los ratones EC-Gαq KO y HA-Gαq wt KI presentaban 3 partos durante el periodo de 5 meses, los cruces con ratones HA-Gαq-PB1 mut KI solo presentaban un parto durante ese mismo periodo (Fig. R13B).

A.



Genotipo	Peso (g) (media ± SEM)
EC-Gαq /Gα11-KO	30,73 ± 1,83
BAC HA-Gαq wt	30,14 ± 1,86
BAC HA-Gαq EEAA	29,56 ± 1,69

B.



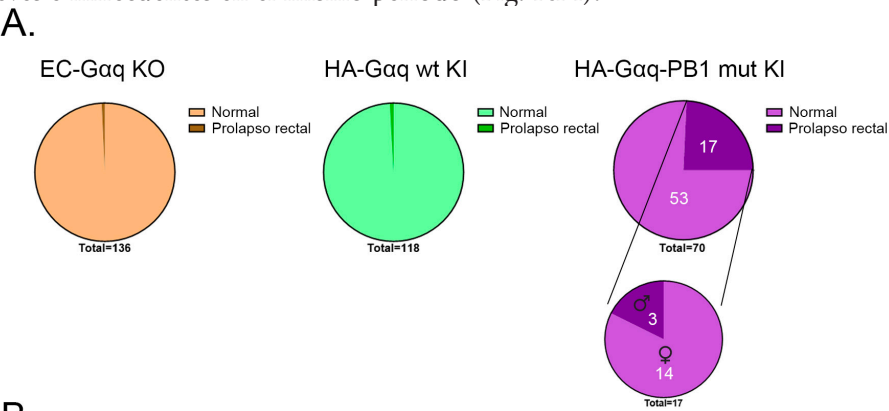
Genotipo	Número de crías (media ± SEM)	Porcentaje de machos (media ± SEM)	Número de partos por cruce (media ± SEM)
EC-Gαq KO	7,7 ± 1,4	57,2 ± 22,7	3,4 ± 1,8
HA-Gαq wt KI	6,0 ± 1,5	54,6 ± 21,0	3,0 ± 0,8
HA-Gαq-PB1 mut KI	4,9 ± 1,0	40,1 ± 25,2	1,2 ± 0,4

**Figura R13. Comparación de diversas características fenotípicas entre los tres genotipos de ratones estudiados.** (A) Peso de los ratones EC-Gαq /Gα11-KO (n=15), BAC HA-Gαq wt (n=16) y BAC HA-Gαq EEAA (n=15) tres meses después de su nacimiento. En la tabla se muestra el resumen de los datos obtenidos (media de los pesos ± SEM de n=15-16). (B) Análisis de los parámetros de fertilidad entre las diferentes líneas de ratones transgénicos: número de crías por parto, porcentaje de machos, y número de partos por cruce (n=15, total de partos; n=5 por cada genotipo). Los datos se representan como la media ± SEM. La significancia estadística se determinó utilizando one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*p<0.05 y \*\*p<0.005.

Los resultados obtenidos muestran que los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI muestran una clara dificultad para procrear, por lo que en un futuro sería muy interesante caracterizar las causas y mecanismos subyacentes.

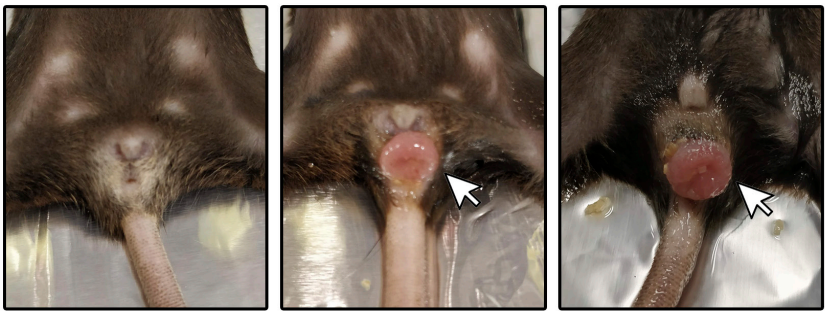
2.5.2. Los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI presentan con frecuencia prolapsos rectales

Llamativamente, se observó que en los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI aparecían prolapsos rectales en un 30% (17 sí /57 no) de los ratones adultos. Principalmente, estos prolapsos se detectaron en hembras (80%, 14 de los 17 prolapsos detectados) a partir de los tres meses de vida. Sin embargo, los ratones EC-Gαq KO (0.01%, 1/135) o HA-Gαq wt KI, (0.01%, 1/117) presentaron una tasa de aparición de prolapsos rectales muy leves e infrecuentes en el mismo periodo (Fig. R14).



B.

Genotipo	Aparición de prolapsos rectales
EC-Gαq KO	No desarrollan prolapsos
HA-Gαq wt KI	No desarrollan prolapsos
HA-Gαq-PB1 mut KI	Desarrollan prolapsos rectales principalmente las hembras a partir de los tres meses de su nacimiento.



**Figura R14. Las hembras de los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI tienen una clara propensión a desarrollar prolapsos rectales.** (A) Incidencia de la aparición de prolapsos a los 3 meses de vida en las diferentes líneas de ratones (EC-Gαq KO (n=136), HA-Gαq wt KI (n=118) y HA-Gαq-PB1 mut KI (n=70). (B) Imágenes representativas de ratones HA-Gαq wt KI (imagen izquierda, hembra) y HA-Gαq-PB1 mut KI (imagen central, hembra e imagen derecha, macho) a los 3 meses de su nacimiento. Las flechas indican los prolapsos rectales de los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI.

La aparición de prolapsos rectales solo en los ratones que expresan HA-Gαq mutado (HA-Gαq-PB1 mut KI) en condiciones basales sugiere, como hemos descrito en el caso de algunos fenotipos vasculares, que la expresión en estos ratones del mutante HA-Gαq-EEAA, al producir un desbalance entre las vías de señalización dependientes o no de la interacción con dominios PB1, podría actuar como dominante negativo sobre la función de la proteína Gαq endógena. En todo caso los mecanismos causantes de la aparición de prolapsos en estos animales están por esclarecer.

### 3. Mecanismos moleculares implicados en la función de Gαq relacionados con su capacidad con interaccionar con proteínas con dominios PB1

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores podemos afirmar que la expresión del mutante de Gαq en el dominio PB1 presenta una serie de implicaciones relacionadas específicamente con la dificultad de interacción de este mutante con proteínas que contienen estos dominios. Además, la expresión de este mutante no sólo no es capaz de rescatar o sustituir a la proteína Gαq endógena, sino que, en algunos contextos, incluso impide que lleve a cabo su función.

En particular, nuestros resultados sugieren que la región de interacción de Gαq con proteínas con dominios PB1 se requiere para la adecuada homeostasis de la permeabilidad celular, así como tiene un importante papel en la inducción de daño agudo pulmonar inducido por LPS en modelos de sepsis (Tabla R2). Durante el desarrollo de esta tesis, además de generar y caracterizar las diferentes líneas de ratones, se ha colaborado de manera activa en la caracterización de las vías de señalización que relacionan Gαq con los procesos de autofagia y las vías de señalización de respuesta antioxidante Keap1/Nrf2, a su vez implicadas en la modulación del edema pulmonar inducido por LPS, como se ha mencionado (ver esquema en Fig.R10) (Dong et al., 2018; Wei et al., 2018; Zhang et al., 2018; Wettschureck et al., 2019).

### 3.1. $G\alpha q$ participa en complejos multimoleculares mTOR/Raptor/p62 relevantes en la modulación de autofagia a través de su región de interacción con dominios PB1

Se ha descrito que el proceso de autofagia se activa en respuesta a un gran número de estímulos relacionados con el daño agudo pulmonar (ALI), entre los que se incluyen infección bacteriana, LPS o sepsis (Wang et al., 2019). Por el contrario, otros estudios relacionan la disminución de la autofagia con un incremento del daño agudo pulmonar y el desarrollo de sepsis, aunque un posterior incremento de la respuesta autofágica favorece la supervivencia (Yen et al., 2013). Se ha descrito también la relación del proceso de autofagia con la integridad de la barrera endotelial tras la inducción de daño pulmonar por LPS (Zhang et al., 2018). Por otra parte, se ha demostrado que, tras un periodo de hiperoxia, que conlleva a la producción de radicales libres de oxígeno, el incremento de la autofagia en células endoteliales de pulmón promueve la inducción de genes involucrados en la respuesta antioxidante, como HO-1 (Zhang, Jiang, Sauler, & Lee, 2013).

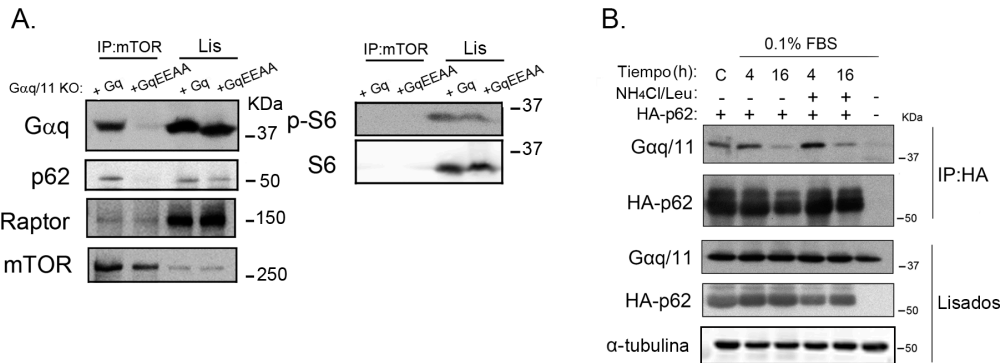
En nuestro laboratorio hemos descrito el papel fundamental de la región de interacción de  $G\alpha q$  con proteínas con dominios PB1 en su asociación con p62/SQSTM1 y en la modulación de la autofagia (Cabezudo, S. et al., 2020, en revisión). Experimentos realizados por la Dra. S. Cabezudo y otros colaboradores indicaron que la carencia de  $G\alpha q/11$  en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, del inglés “Mouse Embryonic Fibroblast”), induce una mayor autofagia basal y una respuesta incrementada, más temprana y prolongada de la autofagia tras diferentes tipos de estrés de nutrientes.  $G\alpha q$  ejerce esta función moduladora de la autofagia facilitando el proceso de activación de mTORC1 en respuesta a distintos tipos de nutrientes, lo que a su vez inhibe autofagia. Esta capacidad de  $G\alpha q$  depende de la presencia de su dominio de interacción con proteínas PB1, ya que no puede ejercerse por el mutante  $G\alpha q$ -EEAA (Cabezudo, S. et al., 2020, en revisión). En ese contexto, nos llamó la atención que una proteína con dominios PB1, denominada p62/SQSTM1, tiene un papel relevante en la autofagia y en la activación de la vía mTORC1 (Duran et al., 2011; Katsuragi, Ichimura, & Komatsu, 2015).

En búsqueda del mecanismo molecular subyacente, se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación en MEFs knockout para  $G\alpha q/11$  (MEFs  $G\alpha q/11$  KO), en las que re-expresaba (knock-in) o bien  $G\alpha q$  wt (MEFs  $G\alpha q$  KI) o el mutante  $G\alpha q$ -EEAA de interacción con proteínas PB1 (MEFs  $G\alpha q$ -EEAA KI) (Fig. R15A). Nuestros datos



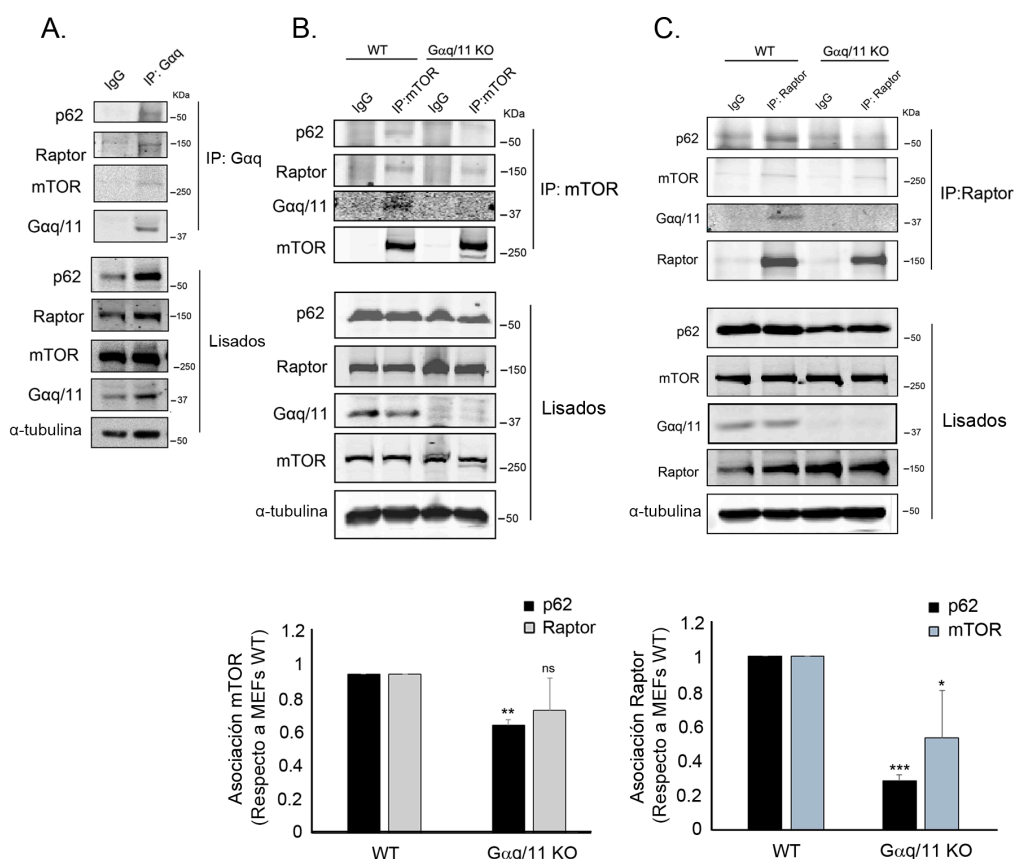
mostraron que la mutación en el dominio *PB1-like* de Gαq redujo drásticamente la asociación de esta proteína con las proteínas p62 y mTOR en comparación con la asociación observada en presencia de la proteína Gαq wt (Fig. R15A). Este resultado es coherente con la implicación de esta región de Gαq en la formación del complejo Gαq/p62/mTOR y en la modulación de mTORC1.

El complejo de activación mTORC1 presenta una modulación dinámica influida por fluctuaciones de nutrientes (Kim & Guan, 2019). De forma interesante, detectamos que la asociación Gαq/p62 estaba regulada por la disponibilidad de nutrientes. Así, tras 16 h de privación de suero se detectó una clara disociación progresiva del complejo Gαq/p62 (Fig. R15B). Comprobamos también que dicha disminución no se debía a la posible degradación potencial de p62 mediada por autofagia en esas condiciones, ya que se observó el mismo efecto en presencia de inhibidores lisosomales (NH<sub>4</sub>Cl/leupeptina).



**Figura R15. Gαq forma parte de complejos mTOR/Raptor/p62 y favorece su asociación en presencia de nutrientes.** (A) La inmunoprecipitación endógena de mTOR fue realizada en células MEFs Gαq/11 KO, a las que se les re-introdujo bien Gαq wt o el mutante Gαq EEEA, en condiciones óptimas de nutrientes (10% FBS). Los inmunoprecipitados de mTOR y los lisados totales fueron analizados por Western Blot, con los anticuerpos específicos indicados, para determinar los componentes del complejo y los niveles de expresión celular, respectivamente. Se muestra un blot representativo de tres experimentos independientes. (B) Células CHO fueron transfectadas de manera transitoria con las construcciones de HA-p62 y Gαq. Las células fueron privadas de suero (0.1% FBS) y tratadas o no con una combinación de NH<sub>4</sub>Cl (20mM) y leupeptina (100μM) (NH<sub>4</sub>Cl/Leu) (N/L) durante las últimas 4 horas del periodo de privación de nutrientes para los tiempos indicados. La proteína HA-p62 se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra HA acoplado a resina de agarosa. Las muestras obtenidas tras la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados por Western Blot con anticuerpos específicos. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes.

En consonancia con estos datos, la co-inmunoprecipitación de Gαq (Fig. R16A) o mTOR (Fig. R16B) endógenos en MEFs wt en condiciones de suficiencia de nutrientes reveló la presencia de Gαq en el complejo mTORC1, junto con otros componentes clave como Raptor y p62. Es importante destacar que la inmunoprecipitación de Raptor endógeno, un componente específico de mTORC1, también reveló la presencia en el mismo complejo de Gαq, p62 y mTOR (Fig. R16C). Por otra parte, las células que carecían de Gαq/11 mostraron una menor asociación de p62 con mTOR (Fig. R16B) o Raptor (Fig. R16C), lo que sugiere que Gαq podría estar favoreciendo la formación del complejo mTOR/p62/Raptor.

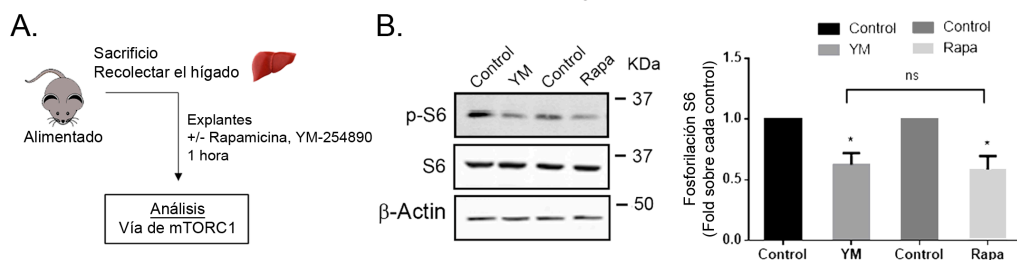


**Figura R16. Complejos Gαq/mTOR/Raptor endógenos. La inmunoprecipitación de Gαq.** (A), mTOR (B) o Raptor (C) endógenos fue llevada a cabo en células MEFs wt (A) o en células MEFs wt y Gαq/11 KO (B-C) en condiciones óptimas de nutrientes (10% FBS). Los blots son representativos de 3-4 experimentos independientes. En (A) y (B) los datos (media ± SEM de 3-4 experimentos independientes) se normalizaron por mTOR total (B) o Raptor (C) y se expresaron como incremento en la asociación con respecto a la condición del control wt. La significación estadística se analizó mediante la prueba t no apareada. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 vs. control wt.

### 3.2. Gαq/11 es capaz de modular el complejo mTORC1 en un sistema “ex vivo”

Tanto estos resultados como los obtenidos paralelamente en el laboratorio parecían indicar que Gαq/11 modular autofagia vía mTORC1, coordinando una adecuada respuesta tras fluctuaciones en la concentración de nutrientes disponibles para el organismo (Cabezudo et al., 2020, en revisión). La disociación de Gαq y p62 en respuesta a diferentes condiciones de estrés de nutrientes (retirada de suero, ausencia de aminoácidos o glucosa) parecía ir en paralelo con la inactivación de la cascada de señalización de mTORC1 y la posterior inducción del proceso de autofagia. Por el contrario, la recuperación de aminoácidos, posterior a un periodo de carencia de nutrientes, recupera la formación del complejo Gαq/p62/mTOR y el ensamblaje del complejo multi-molecular activo de mTORC1 (Cabezudo et al., 2020, en revisión). Coherente con ese modelo, el pre-tratamiento de células MEFs wt con un inhibidor de Gαq/11, YM-254890, provocó una disminución de la reactivación de mTORC1 tras la administración de nuevo de aminoácidos (Cabezudo et al., 2020, en revisión).

Con el objetivo de confirmar que Gαq/11 es un modulador relevante del complejo mTORC1 en un modelo más fisiológico, explantes de hígado obtenidos de ratones EC-Gαq KO (en ausencia de tratamiento con tamoxifeno, pero que tienen delección global de G11), y alimentados con dieta normal, fueron tratados con YM-254890 o con rapamicina (inhibidor de mTOR) durante 1 hora. Posteriormente, se analizó el estado de activación de la vía de señalización de mTORC1, analizando los niveles de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Fig. R17A). En estas condiciones de suficiencia de nutrientes, tanto rapamicina como el inhibidor de Gαq/11 inhibieron de forma comparable la activación de mTORC1 (Fig. R17B).



**Figura R17. Modulación “ex vivo” de la vía mTORC1 por Gαq/11.** (A) Diagrama explicativo del análisis de la vía de mTORC1 en explantes de hígado de ratones EC-Gαq KO alimentados con dieta normal y expuestos al tratamiento con YM-254890 (40μM) o Rapamicina (500nM). (B) Se muestra un blot representativo y los datos normalizados de la fosforilación de S6 (media ± SEM de 4 ratones). La significancia estadística fue analizada mediante la prueba t no apareada. \*p < 0.05.

En la figura R18 se muestra un esquema del modelo de participación de Gαq en la modulación de mTORC1 y autofagia a través de sus interacciones con p62. Esta proteína es capaz de interactuar, por dominios distintos a PB1, con diferentes componentes del complejo mTORC1 (Raptor, Rags), lo que permite la translocación de mTOR al lisosoma (Duran et al., 2011). En condiciones **óptimas** de nutrientes (presencia de suero, aminoácidos o glucosa) se fomentaría la interacción Gαq y p62, que conduciría a la activación de mTORC1 y la preservación de niveles bajos de autofagia homeostática. En condiciones de estrés debido a la falta de nutrientes, la disociación Gαq/p62 facilitaría la activación autofágica. Gαq podría actuar como una proteína andamio clave en el control de la autofagia en respuesta a diferentes tipos de estrés nutricional (Cabezudo et al, 2020, en revisión).

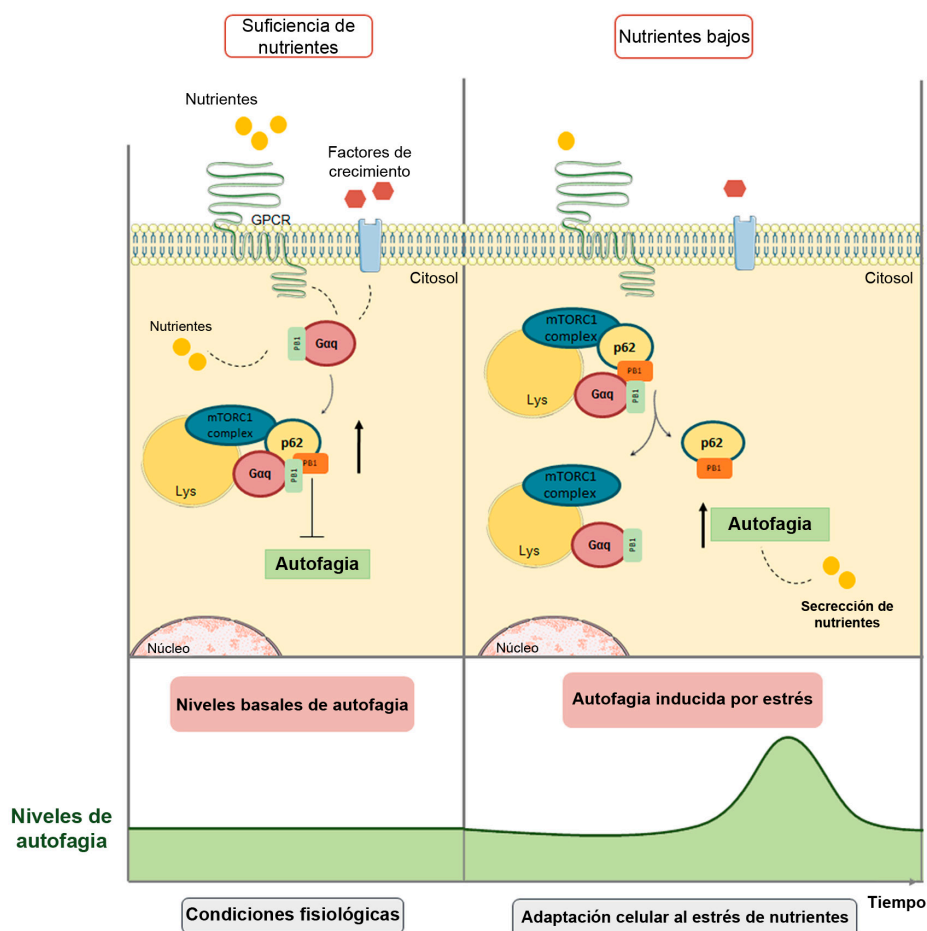


Figura R18. Esquema del papel propuesto para Gαq en el ensamblaje del complejo mTORC1 activo y su repercusión en la modulación de autofagia en respuesta a diferentes tipos de estrés nutricional.

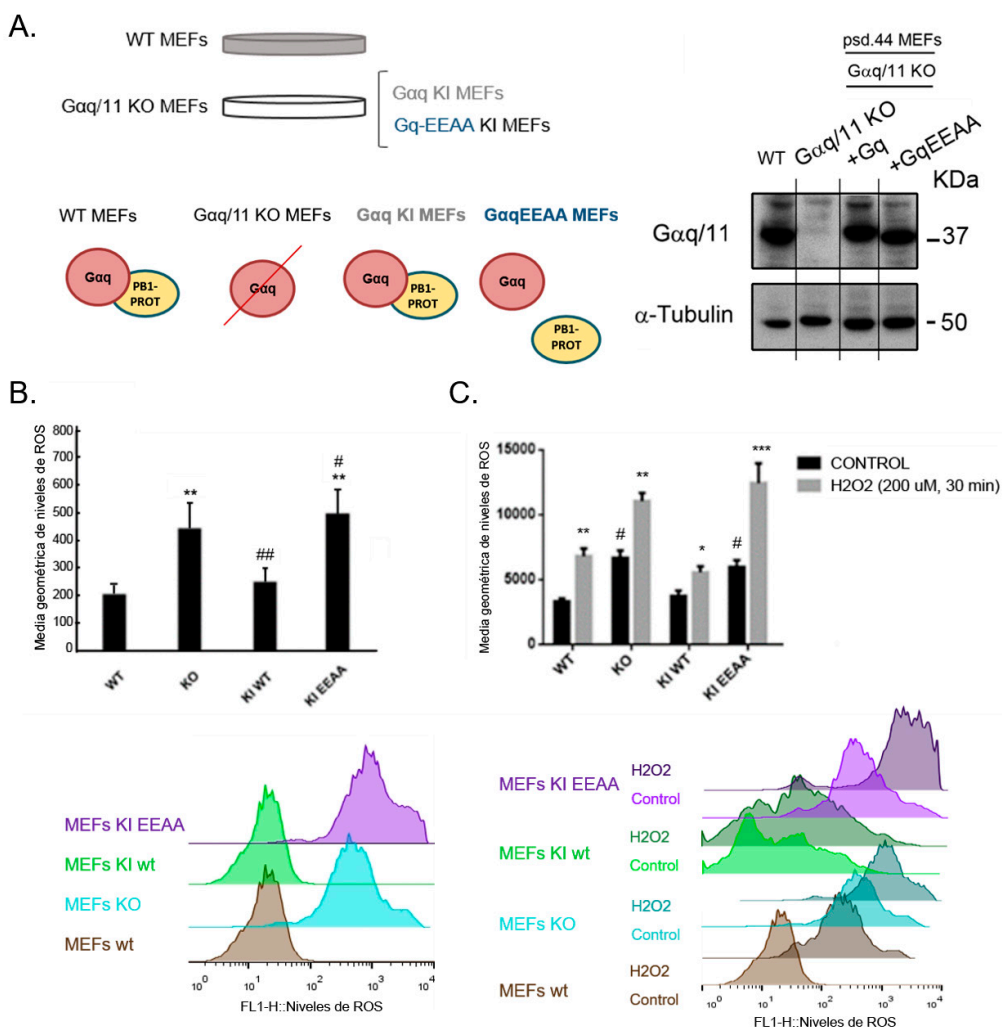
Parte superior: en condiciones óptimas de nutrientes, la presencia de suero, aminoácidos o glucosa fomentaría la interacción a través de dominios PB1 entre Gαq y p62, lo que conlleva la estimulación basal de mTORC1 y la preservación de bajos niveles de autofagia homeostática. Tras la privación de nutrientes, se induce la disociación de Gαq y p62, que llevaría a la inhibición de mTORC1 y por el contrario facilitaría la participación de p62 en el proceso de autofagia. La posterior liberación de nutrientes internos durante la autofagia facilitaría más adelante la formación y reactivación del complejo Gαq/p62/ mTORC1 con el consiguiente bloqueo de autofagia. Parte inferior: diagrama que muestra los niveles de autofagia alcanzados en ambas condiciones. Figura modificada de (Cabezudo et al, 2020, en revisión).

#### 4. Papel de Gαq en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo

Además de participar en autofagia y en el control del nodo de señalización mTORC1 en los lisosomas la proteína multifuncional p62 está implicada en la regulación de la vía Keap1-Nrf2, encargada de controlar la respuesta celular antioxidante (Katsuragi et al., 2015). Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) es una subunidad adaptadora de la E3 ubiquitina ligasa Cullin 3, implicada en la degradación de Nrf2. p62 es capaz de asociarse con Keap1 a través de su dominio de interacción con Keap1 (KIR). La asociación de p62 con Keap1 libera a la proteína Nrf2 de su complejo con Keap1, permitiendo a Nrf2 acumularse y translocarse al núcleo, donde activa la respuesta antioxidante estimulando oxigenasas como la hemoxigenasa 1 (HO-1), implicada en la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ichimura et al., 2013). Como se mencionó anteriormente (esquema en Fig. R10), la presencia de antioxidantes como tBHQ o la activación de la autofagia protege a través de la vía Nrf2 a las células endoteliales pulmonares del daño provocado por el LPS (Dong et al., 2018; Zhang et al., 2018). En este contexto, nos preguntamos si la asociación Gαq/p62 que hemos descrito y/o la funcionalidad de Gαq podrían también ser relevantes en la regulación del estrés oxidativo y de las vías protectoras que dependen de la activación de Nrf2.

##### 4.1. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes en la regulación de especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo ocurre cuando las células generan y acumulan un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) o tras una estimulación extracelular (como sería el caso del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cuando existe un desbalance en la respuesta antioxidante, se producen numerosos productos oxidantes no deseables, que pueden generar apoptosis, necrosis o autofagia (Jia et al., 2017).



**Figura R19. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes en la regulación de especies reactivas de oxígeno.** (A) Las células knock-in MEFs Gαq KI y Gαq-EEAA KI fueron generadas como se describe en la sección de Métodos. En el esquema se muestran las diferentes líneas de MEFs utilizadas junto con su capacidad de interaccionar con proteínas que presentan dominios PB1. Se muestra un blot representativo de los niveles de Gαq/11 en cada una de estas líneas celulares. (B) Las especies reactivas de oxígeno fueron cuantificadas en las distintas MEFs (wt, Gαq/11 KO, Gαq KI, Gαq-EEAA KI) mediante el uso del kit ROS/Superoxide Detection Assay (Abcam), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (ver sección de Métodos). Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD-Bioscience). Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo (TreeStar) y se representaron como la media±SEM de 4 experimentos independientes. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\*p<0.01 respecto a WT. #p<0.05, ##p<0.01 respecto a Gαq/11 KO. Se muestra también un histograma representativo. (C) Las especies reactivas de oxígeno fueron cuantificadas en las líneas de MEFs (wt, Gαq/11 KO, Gαq KI, Gαq-EEAA KI) mediante el uso de la sonda fluorescente CellROX™ Deep Red

(Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante (ver sección de Métodos). Se utilizó como control positivo el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante los 30 minutos previos al ensayo de citometría de flujo. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo mediante el citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD-Bioscience). Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo (TreeStar) y se representaron como la media±SEM de 3 experimentos independientes. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 respecto al tratamiento control. #p<0,05 respecto a las células MEF wt con tratamiento control. Se muestra también un histograma representativo.

Para determinar la implicación potencial de la región de interacción de Gαq a proteínas con dominios PB1 en la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno, se analizaron los niveles de ROS en diferentes líneas establecidas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF): knockout para Gαq/11 (MEFs Gαq/11 KO) y knock-in, o bien de Gαq wt (MEFs Gαq wt KI) o del mutante Gαq-EEAA de interacción con proteínas PB1 (MEFs Gαq-EEAA KI) (Fig. R19A). De forma interesante, las células Gαq/11 KO y las células knock-in que expresan de manera estable el mutante Gαq-EEAA mostraron niveles de especies reactivas de oxígeno significativamente más elevados que las MEF wt (Fig. R19B-C). Por el contrario, las células knock-in que expresan de manera estable de Gαq wt presentaron niveles de ROS similares a las células MEFs wt (Fig. R19B-C).

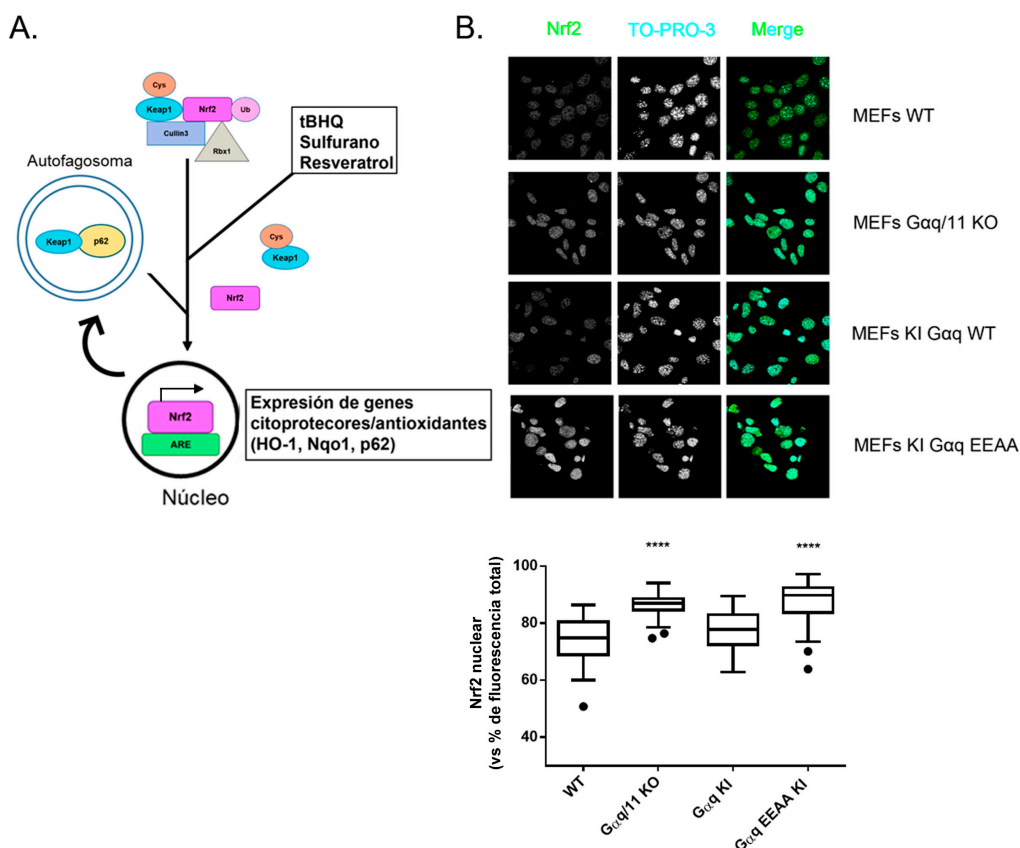
Además de mostrar mayores niveles basales de ROS, las MEF sin Gαq/11 o que expresan la proteína Gαq incapaz de interaccionar con proteínas con dominio PB1 parecen ser también más tendentes a acumular especies reactivas de oxígeno en presencia de agentes de estrés oxidativo como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. R19C). Estos datos sugieren que una Gαq plenamente funcional es relevante para la homeostasis de ROS.

#### **4.2. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes para la modulación de Nrf2**

Como ya hemos comentado, uno de los principales reguladores de la actividad de Nrf2 es la proteína Keap1, y ambas intervienen en la protección de las células contra el daño oxidativo (Taguchi et al., 2011). En condiciones basales, Nrf2 está constantemente ubiquitinada por el complejo formado por Keap1 y la ubiquitina ligasa E3, Cul3, y es rápidamente degradada por el proteasoma. Cuando la célula está expuesta a condiciones de estrés oxidativo, dos residuos de cisteína de Keap1 se modifican permitiendo la inactivación de la función de ubiquitina ligasa, de tal modo que Nrf2 se estabiliza y se transloca al núcleo provocando la activación de una batería de genes citoprotectores, entre los que se encuentra HO-1 (Taguchi et al., 2011). La disponibilidad de Keap1



puede también modularse por autofagia a través de su interacción con p62 (Fig. R20A).



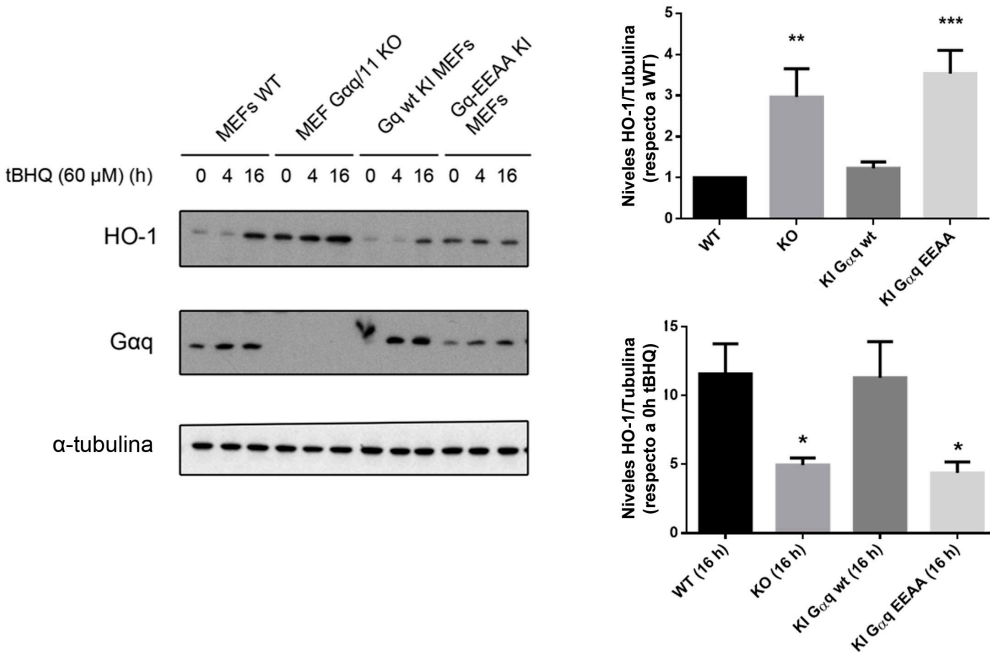
**Figura R20. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 son importantes para la localización de Nrf2.** (A) Esquema representativo de la activación de la vía de respuesta antioxidante Keap1/Nrf2. (B) Las células MEFs (wt, Gαq/11 KO, Gαq KI, Gαq-EEAA KI) se analizaron mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Nrf2 y se realizó un análisis de imagen como se detalla en la sección de Métodos. La cuantificación del área nuclear se determinó mediante la tinción con TO-PRO-3 y su co-localización con Nrf2, y los resultados se normalizaron con respecto a la fluorescencia total de la célula, tal y como se detalla en el apartado de Métodos. Los datos se representaron como la media ± SEM de 5 experimentos independientes. Se muestran imágenes representativas. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\*\*\*p<0.0001 respecto a las células MEFs wt.

Cuando analizamos los niveles de Nrf2 nuclear en las diferentes líneas celulares establecidas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) del apartado anterior, se aprecia que las células “knock-in” que expresan de manera estable la proteína Gαq wt (MEFs Gαq KI) presentaron niveles de expresión nuclear de Nrf2 similares a las células



wt. Sin embargo, las células sin Gαq/11 (MEFs Gαq/11 KO) y las MEFs Gαq-EEAA KI mostraron niveles de Nrf2 nucleares similares y significativamente más elevados que las MEF wt (Fig. R20B).

Está bien descrito que la activación de Nrf2 en respuesta a estrés oxidativo provoca el incremento transcripcional del RNA mensajero de proteínas implicadas en las rutas de detoxificación celular de las especies reactivas de oxígeno, como la hemoxigenasa 1 (HO-1) (Loboda et al., 2016). Nuestros resultados muestran que las células sin Gαq/11 presentaban mayores niveles en la expresión total de la proteína HO-1 comparadas con las células control (Fig. R21). Las células que re-expresan de manera estable la proteína Gαq wt (MEFs Gαq KI), recuperan los niveles de HO-1 basales de las células wt, pero las MEFs Gαq-EEAA KI que expresan Gαq mutado en su dominio PB1 no (Fig. R21).



**Figura R21. La presencia de Gαq/11 y su región de interacción con dominios PB1 modulan la inducción de la respuesta antioxidante dependiente de Nrf2.** (A) Las células MEFs (wt, Gαq/11 KO, Gαq KI, Gαq-EEAA KI) fueron estimuladas o no con el compuesto tBHQ (60 μM) durante los tiempos indicados. La modulación de la activación de la respuesta antioxidante a través de Nrf2 se analizó mediante la determinación los niveles de la proteína HO-1. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. Los niveles de la proteína HO-1 para el tiempo inicial (panel superior) o a las 16 h de tratamiento (panel inferior) fueron normalizados por los niveles de α-tubulina y se representaron como la media ± SEM de 3 experimentos independientes. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 respecto a las células MEFs wt.

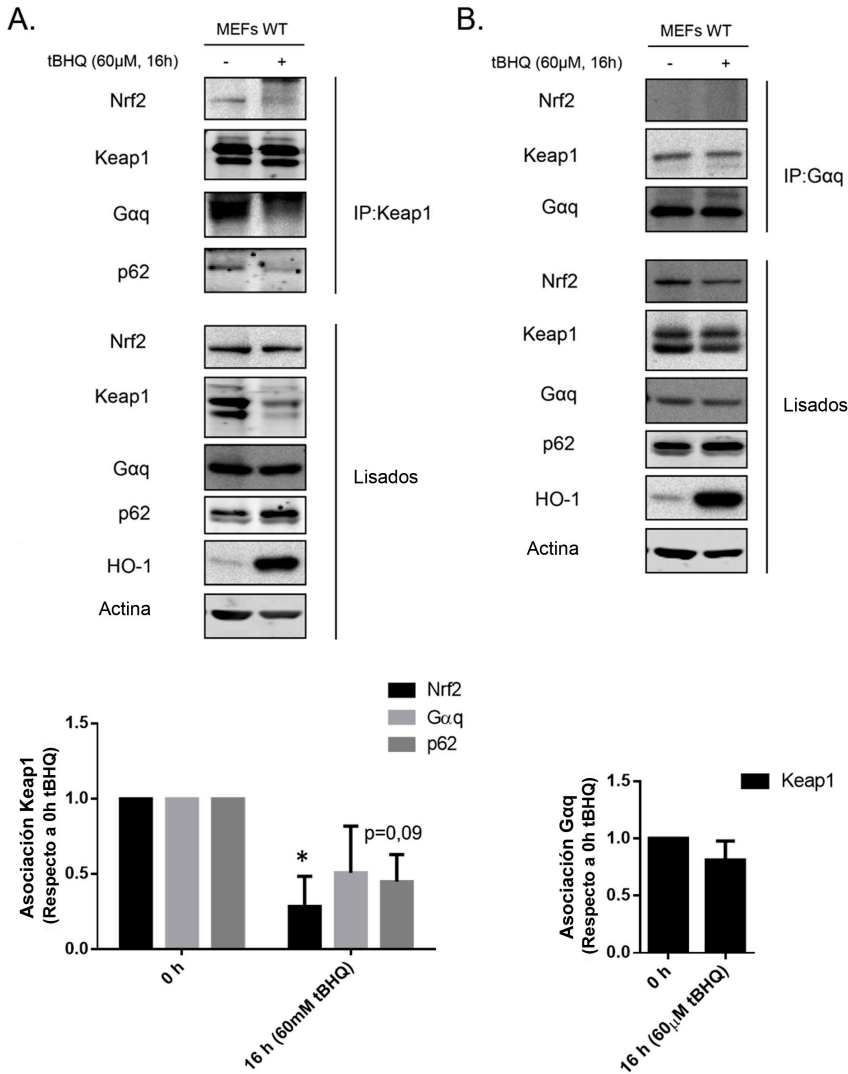
Cuando comparamos en estos modelos celulares la capacidad de activación de las vías antioxidantes de Keap1/Nrf2 tras la estimulación con tBHQ (60  $\mu\text{M}$ ) durante 16 horas, se observó que tanto las células MEFs wt como las células MEFs G $\alpha$ q KI presentaron un incremento de la respuesta antioxidante del orden de 10 veces respecto a las células sin estimular (Fig. R21). Sin embargo, el tratamiento con tBHQ en las MEFs G $\alpha$ q/11 KO y G $\alpha$ q-EEAA KI indujo un menor incremento relativo de los niveles de HO-1 (de 5 veces) sobre los niveles basalmente incrementados de esta proteína (Fig. R21).

### 4.3. Keap1 como posible efector de G $\alpha$ q/11

Tal como se ha descrito anteriormente, p62 juega un papel muy relevante como regulador del proceso de autofagia. En condiciones de estrés oxidativo se promueve la asociación de p62 con Keap1 a través de su dominio KIR (del inglés “Keap1-Interacting Region”), que induce la degradación de Keap1 por autofagia dependiente de p62 (Taguchi et al., 2012; Cloer et al., 2018). Por otra parte, Keap1 junto con Cul3 y Rbx1 puede ubiquitinar a p62 y regular su activación a través de la formación de oligómeros activos unidos a través de su dominio PB1 (Sánchez-Martín and Komatsu, 2018). Dado que G $\alpha$ q interacciona con dominios PB1 de p62 con un papel importante en la modulación de la autofagia, nos preguntamos si también podría formar parte de estos complejos p62/Keap1 y/o participar en su regulación.

#### 4.3.1. Asociación endógena entre G $\alpha$ q y Keap1

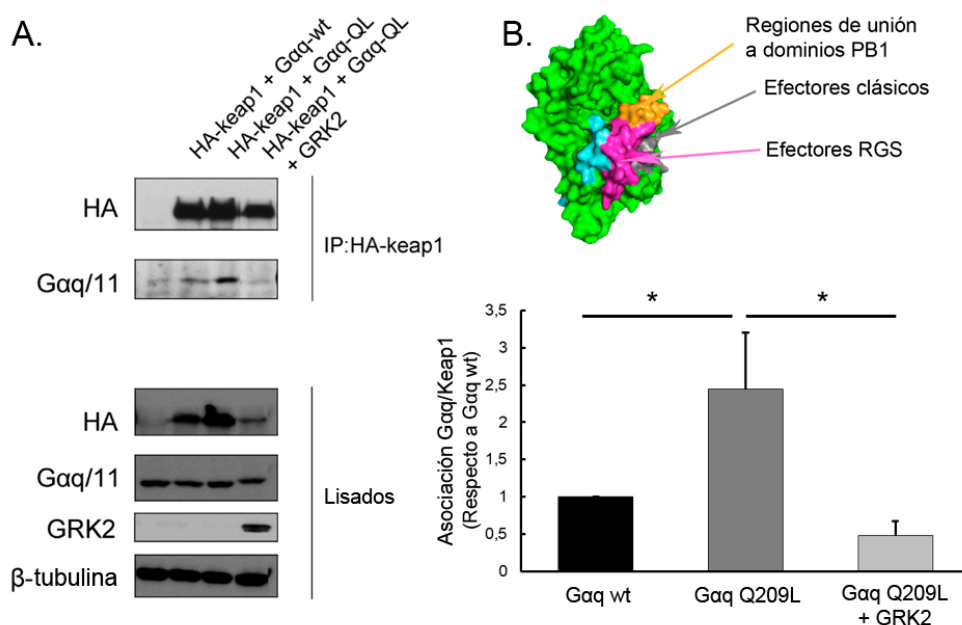
Con el objeto de explorar la posible existencia de complejos endógenos entre G $\alpha$ q y Keap1, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en la *línea celular* de MEF wt, utilizando anticuerpos específicos. Tanto inmunoprecipitando Keap1 como G $\alpha$ q, pudimos observar la presencia de estos complejos Fig. R22). Además, al promover la activación de la vía Keap1/Nrf2 mediante tBHQ se observó en inmunoprecipitados de Keap1 una reducción significativa de su asociación con Nrf2 cercana al 70%, y una tendencia a una menor asociación con G $\alpha$ q y p62. Esta modulación no es apreciable al inmunoprecipitar con G $\alpha$ q (Fig. R22).



**Figura R22. Gαq es capaz de asociarse con Keap1.** (A) El ensayo de inmunoprecipitación de la proteína endógena Keap1 fue llevado a cabo en células MEFs wt que previamente fueron tratadas o no con el compuesto tBHQ (60 μM) durante 16 horas, mediante la incubación de 3 mg de lisado total con 0.5 μg/ml con el anticuerpo contra Keap1, como se especificó en la sección de Métodos. Los productos de la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados mediante Western Blot con los anticuerpos específicos que se detallan en la figura. Como control de carga se utilizó la proteína actina. Se muestran los blots representativos de 3 experimentos independientes. Los datos se representaron como la media ± SEM de 3 experimentos independientes, normalizados por Keap1 total y expresados como incremento en la asociación con respecto a la condición de control wt. La significación estadística se analizó mediante la prueba t no apareada con dos colas. \*  $p < 0.05$  vs. Control wt. (B) El ensayo de inmunoprecipitación de la proteína endógena Gαq fue realizado en células MEFs wt siguiendo el protocolo desarrollado en (A). Los inmunoprecipitados y los lisados totales fueron analizados mediante Western Blot utilizando los anticuerpos específicos mostrados en la figura. La proteína actina fue utilizada como control de carga. Se muestra un blot representativo de 2 experimentos independientes. Los datos se representaron como la media ± SEM.

### 4.3.2. La activación de Gαq favorece la asociación de Gαq con Keap1

Para explorar si el complejo formado entre Gαq/Keap1 se forma de manera dependiente de activación de Gαq, llevamos a cabo experimentos en células HEK 293, sobreexpresando Gαq wt o Gq-Q209L, una construcción constitutivamente activa de Gαq con actividad GTPasa deficiente, junto con HA-Keap1. Se observó que las células que sobreexpresaban el mutante constitutivamente activo mostraban mayor interacción con Keap1 en comparación con la proteína Gαq wt (Fig. R23). Estos resultados sugieren que la asociación Gαq/Keap1 está potenciada por la activación de Gαq, como ha sido establecido para otros efectores de Gαq.



**Figura R23. La asociación de Gαq y Keap1 se encuentra aumentada en respuesta a la activación de Gαq y se modula de manera negativa por GRK2.** (A) Las células HEK 293 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para HA-Keap1 en combinación con Gαq wt o el mutante de Gαq constitutivamente activo (Gαq-QL), en presencia o ausencia de GRK2. La proteína HA-Keap1 se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra HA acoplado a una resina de agarosa. Las muestras obtenidas tras la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados por Western Blot con los anticuerpos específicos. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. Los datos se representaron como la media del incremento en la asociación ± SEM. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*p < 0.05. (B) La estructura de Gαq fue modelada a partir de la estructura cristalizada de Gαq-GRK2-Gβ usando el software Pymol. Las diferentes regiones de unión están destacadas en rosa (región del switch I y II, efectores RGS), gris (switch III, GRK2) y amarillo (región β4-α3 de Gαq, región de unión PB1).

#### ***4.3.3. La asociación Gαq/Keap1 se inhibe en presencia de GRK2***

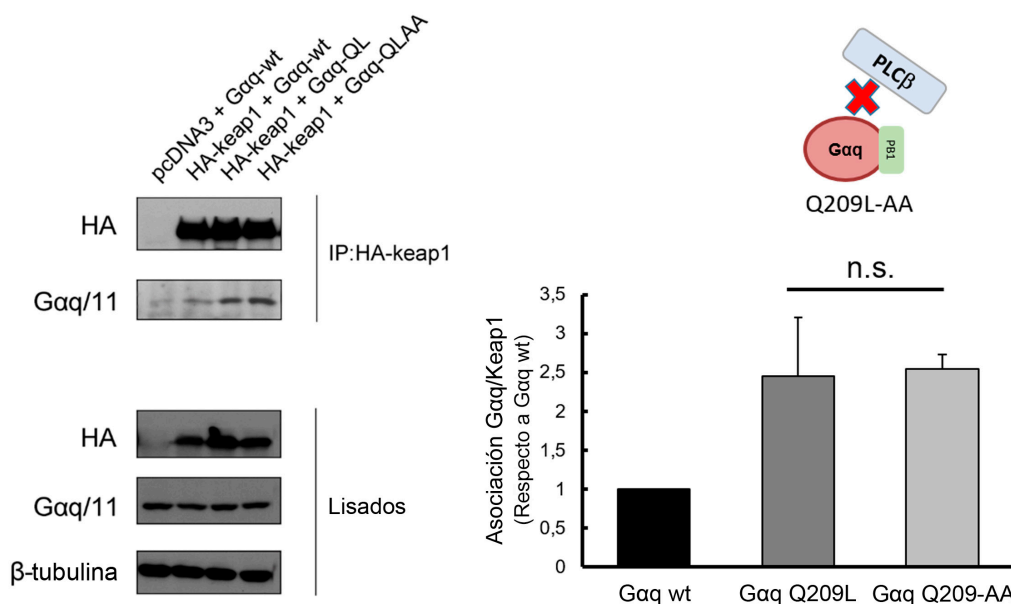
Además del papel que la quinasa de receptores acoplados a proteínas G 2 (GRK2) juega en la desensibilización de los GPCR, esta quinasa regula de manera negativa la unión de Gαq a sus efectores a través de su interacción con esta subunidad con el dominio N-terminal RH de GRK2, bloqueando la señalización (Sterne-Marr et al., 2003).

Con el objeto de determinar si, del mismo modo que ocurre con otros efectores, GRK2 podría modular la formación del complejo Gαq/Keap1, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación en los que se sobreexpresó Gαq constitutivamente activo y Keap1 en presencia o ausencia de GRK2 en células HEK 293 (Fig. R23). Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de GRK2 es capaz de reducir drásticamente la asociación de Gαq con Keap1.

#### ***4.3.4. La asociación entre Gαq y Keap1 es independiente de la región clásica de unión de efectores de Gαq***

La cristalización de complejos de Gαq con distintos efectores y estudios de mutagénesis han permitido identificar las regiones y los aminoácidos esenciales implicados en su interacción con diversas proteínas celulares. La región de los *switch III/III* de Gαq contiene los residuos esenciales para la interacción con PLCβ, GRK2 y p63RhoGEF y es conocida como la región clásica de unión de efectores de Gαq (Medina, Grishina, Meloni, Muth, & Berlot, 1996; Ballou, Lin, Fan, Jiang, & Lin, 2003), mientras que los sitios claves de unión con PKCζ y p62 (con dominios PB1) o con las proteínas moduladoras RGS están localizados en diferentes posiciones, si bien en superficies colindantes (Fig. R23B).

Para determinar si la región clásica de unión de efectores es la responsable de la unión de Keap1, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación en los que se utilizaron mutantes de Gαq que tienen impedida la interacción con efectores/reguladores como PLCβ y p63RhoGEF (Gαq Q209L-AA). Se observó que los mutantes constitutivamente activos de Gαq que no pueden interaccionar con efectores clásicos no veían comprometida la formación del complejo Gαq/Keap1 (Fig. R24). Estos resultados nos sugieren que la formación del complejo Gαq/Keap implica a otras regiones funcionales de esta proteína.



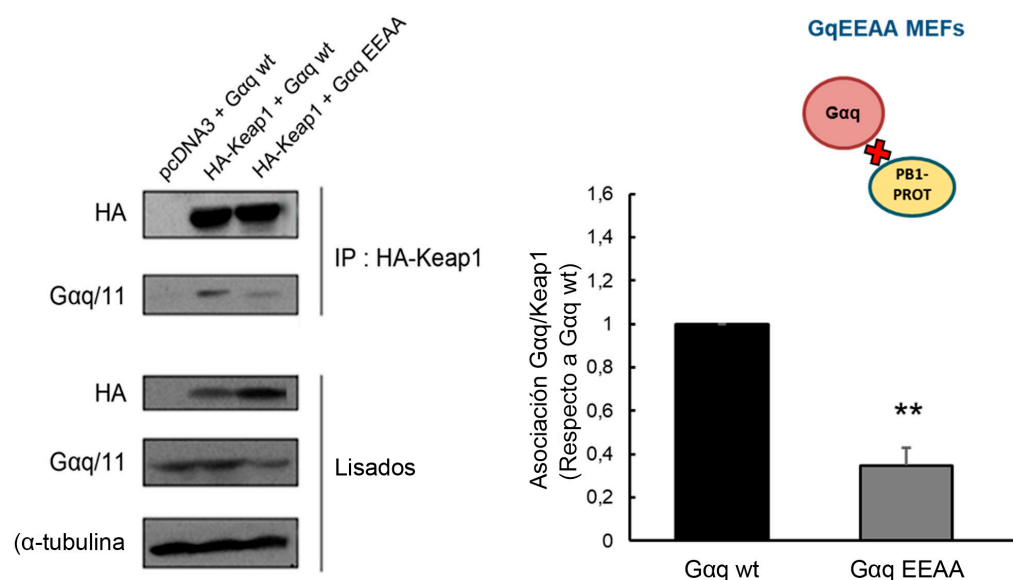
**Figura R24. La asociación entre Gαq y Keap1 es independiente de la región clásica de unión de efectores de Gαq.** Las células HEK 293 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para HA-Keap1 en combinación con Gαq wt, el mutante de Gαq constitutivamente activo (Gαq-QL) o el mutante de Gαq que tiene impedida la interacción con efectores/reguladores como PLCβ y p63RhoGEF (GαqQL-AA). La proteína HA-Keap1 se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra HA acoplado en una resina de agarosa. Las muestras obtenidas de la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados por Western Blot con los anticuerpos específicos. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. Los datos se representaron como la media del incremento en la asociación ± SEM. La significancia estadística fue analizada mediante one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \* $p < 0.05$ . n.s., no significativo.

#### 4.3.5. Papel de la región interacción con dominios PB1 de Gαq en la asociación Gαq/Keap1

La región adyacente al lazo  $\beta 4$ - $\alpha 3$  de Gαq ha sido descrita por nuestro grupo como la responsable de la asociación con el dominio PB1 de PKCζ y p62 (Sánchez-Fernández et al., 2016; Cabezudo, S. et al., 2020, en revisión). Dado que p62 se asocia a Keap1 a través de su dominio de interacción con Keap1 (KIR) (Komatsu et al., 2010), nos preguntamos si Gαq podría formar parte de un complejo ternario Gαq/p62/Keap1 de forma indirecta a través de su asociación con p62.

Experimentos de co-inmunoprecipitación en células HEK-293 mostraron que la asociación entre Keap1 y Gαq-EEAA, mutante en la región de interacción con dominios PB1, se reducía cerca de un 60% respecto a la asociación con la proteína wt

(Fig. R25). Esta inhibición parcial sugería que la región de interacción con dominios PB1 es importante para la asociación de Gαq, pero no descartaba que otras regiones pudieran estar implicadas en una asociación directa entre Gαq y Keap1.



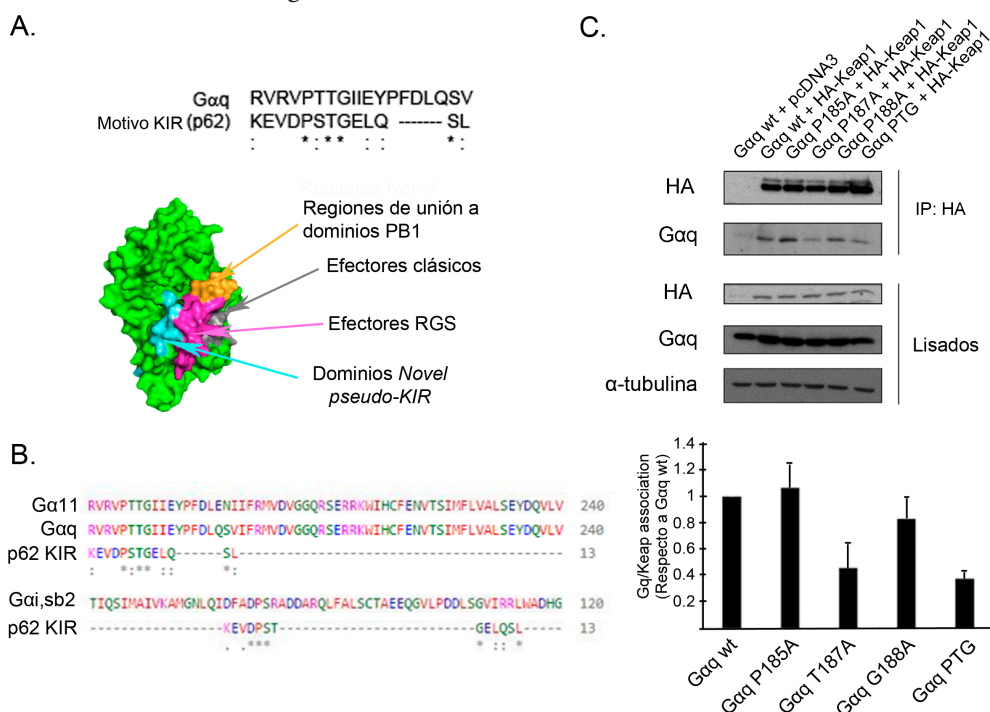
**Figura R25. Papel de la región interacción con dominios PB1 de Gαq en la asociación Gαq/Keap1.** Las células HEK 293 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para la expresión de HA-Keap1 en combinación con Gαq wt o el mutante de Gαq en su región de interacción con dominios PB1 (Gαq EEEA). La proteína HA-Keap1 se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra HA acoplado a una resina de agarosa. Las muestras obtenidas tras la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados por Western Blot con anticuerpos específicos. Los lisados fueron testados para detectar la expresión de las diferentes proteínas sobreexpresadas y se utilizó α-tubulina como control de carga. Se muestra un blot representativo de 3 experimentos independientes. Los datos se representaron como la media del incremento de la asociación ± SEM. La significación estadística se analizó mediante la prueba t no apareada con dos colas. \*\*p < 0.01 vs. Gαq wt.

#### 4.3.6. Identificación de un pseudo-motivo KIR en la región de unión de efectores de Gαq

Con el objeto de detectar otras posibles regiones de Gαq que pudieran estar involucradas en su interacción con Keap1 y poder llevar a cabo una estrategia racional de mutagénesis dirigida, se realizó un análisis de las superficies de unión dentro de la región C-terminal de Gαq. Realizamos alineamientos entre las secuencias del dominio ya descrito de interacción con Keap1 (KIR) de p62 con la proteína Gαq. El análisis comparativo entre el dominio KIR de p62 y la región efectora de Gαq nos reveló que



compartían una llamativa homología de secuencia, especialmente en 3 residuos, P185, T187 y G188, localizados dentro de la región comprendida en el lazo  $\beta 3$ - $\alpha 2$  (Fig. R26A), y que han sido descritos como los residuos más importantes para la asociación de p62 con Keap1 (Komatsu et al., 2010). Estos residuos también se conservan en otra de las subunidades de la subfamilia  $G\alpha_q$ , como es  $G\alpha_{i1}$ , pero no en otras proteínas  $G$  de la subfamilia  $G\alpha_i$ . (Fig. R26B).



**Figura R26. Identificación de un pseudo-dominio KIR en la región de unión de efectores de  $G\alpha_q$ .** (A) Alineamiento de secuencia de la región de interacción con Keap1 (KIR) de p62 con  $G\alpha_q$ . Existe una homología de secuencia en una región específica con 3 residuos (P(185), T(187) y G(188)) marcados con asteriscos. La estructura de  $G\alpha_q$  fue modelada a partir de la estructura cristalizada de  $G\alpha_q$ -GRK2-G $\beta$  usando el software Pymol. Las diferentes regiones de unión están destacadas en rosa (región del switch I y II, efectores RGS), gris (switch III, GRK2), amarillo (región  $\beta 4$ - $\alpha 3$  de  $G\alpha_q$ , región de unión PB1) y azul (región  $\beta 3$ - $\alpha 2$  de  $G\alpha_q$ , nueva región KIR). (B) Alineamiento de secuencia de la región de interacción con Keap1 (KIR) de p62 con diferentes miembros de la subfamilia  $G\alpha$ . Se han marcado con asteriscos los residuos idénticos. (C) Las células HEK 293 fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para la expresión de HA-Keap1 en combinación con  $G\alpha_q$  wt o los diferentes mutantes de  $G\alpha_q$  en su región pseudo-KIR ( $G\alpha_q$  P185A,  $G\alpha_q$  T187A,  $G\alpha_q$  G188A y  $G\alpha_q$  PTG). La proteína HA-Keap1 se inmunoprecipitó con el anticuerpo contra HA acoplado a una resina de agarosa. Las muestras obtenidas tras la inmunoprecipitación y los lisados totales fueron analizados por Western Blot con los anticuerpos específicos. Los lisados fueron testados para detectar la expresión de las diferentes proteínas sobreexpresadas y se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Los datos se representaron como la media del incremento de la asociación  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística fue analizada utilizando un análisis one-way ANOVA seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  para la asociación respecto a  $G\alpha_q$  wt.



Se generaron por tanto una serie de mutantes en los que los residuos clave de Gαq fueron sustituidos de forma individual (P185, T187, G188) o de forma conjunta (triple mutante, P185-T187-G188, denominado PTG) por residuos de Alanina (A). Estos mutantes fueron sobreexpresados en células HEK-293 junto con HA-Keap1 y se realizó una inmunoprecipitación contra el péptido HA. Observamos que tanto el mutante de Gαq en el residuo T187 como el triple mutante PTG reducen su asociación con Keap1 en más de un 60% con respecto a la proteína wt (Fig. R26C). La identificación de esta nueva región de interacción en la proteína Gαq implicada en la formación de complejos con Keap1 abre el camino para investigar en el futuro su papel funcional en la modulación de la respuesta antioxidante.

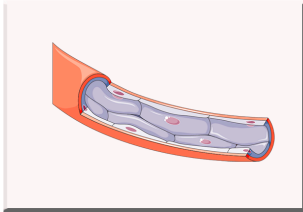
## *DISCUSIÓN*

## La región de interacción con dominios PB1 de Gαq afecta a la modulación de la hemostasis

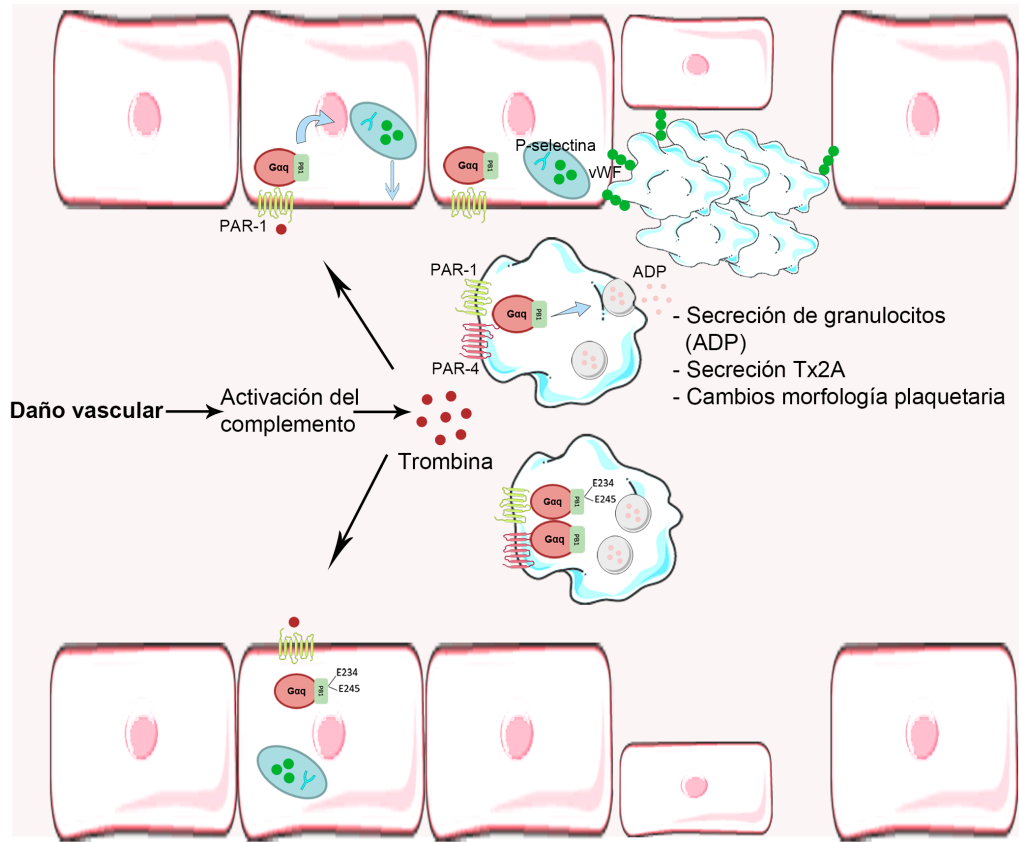
La homeostasis de los vasos sanguíneos durante los procesos de daño vascular es esencial para poder llevar a cabo una respuesta celular coordinada que produzca una trombosis vascular eficaz (De Candia, 2012; Alberelli & De Candia, 2014; Li et al., 2020). Durante la trombosis arterial, las plaquetas se adhieren al endotelio dañado con el colágeno subendotelial y a su vez las células endoteliales liberan el factor de Von Willebrand (en inglés, vWF) que incrementa la agregación plaquetaria (Cleator et al., 2006; Li et al., 2020). Las plaquetas agregadas no solo forman el trombo, sino que son capaces de liberar mediadores inflamatorios que permiten reclutar neutrófilos. Este reclutamiento de neutrófilos permitirá una liberación de citoquinas y generación de especies reactivas de oxígeno que inducirán inflamación y daño del tejido. Además, la liberación de trombina a través de la cascada de coagulación en el sitio donde se produjo el daño también puede inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias. Existen una serie de receptores celulares involucrados en la coordinación de la formación de trombos de las plaquetas y el endotelio vascular (Schouten et al., 2008). Así, se ha descrito que diversos GPCRs y sus vías de señalización asociadas participan en esta señalización trombo-inflamatoria (Li et al., 2020). En el caso de las plaquetas, se necesita de un balance muy delicado entre su estado de quiescencia y activación en una gran variedad de condiciones de flujo hemodinámico, que en su gran mayoría está controlado por GPCRs (Offermanns, 2006; Pasma et al., 2019). En concreto, la liberación de factores agonistas, como la trombina, adenosina difosfato (ADP) y tromboxano A2 son capaces de activar las plaquetas a través de sus respectivos GPCRs, que se acoplan a Gαq y, a través de la interacción con PLCβ, promueven la hidrólisis de PIP2 para liberar DAG e IP3 (Offermanns, 2006).

Los resultados de esta Tesis Doctoral revelan que la expresión de la proteína Gαq mutada en la región de interacción con dominios PB1 provoca una desregulación de la correcta hemostasis. Los ratones en los que se eliminó Gαq endotelial presentaban mayores niveles de sangrado que los ratones control, tal como ya estaba descrito en animales sin Gαq/11 (Offermanns et al., 1997) o sin el receptor P2Y1 (Fabre et al., 1999). En los ratones knock-in con expresión global de la proteína HA-Gαq wt detectamos patrones de sangrado similares a los que presentan los animales control, a pesar no tener Gαq endógeno en endotelio, apoyando el papel esencial que juega Gαq para la correcta hemostasis. Sin embargo, los ratones HA-Gαq-PB1 mut KI que

expresan la proteína  $G\alpha_q$  mutada presentan mayores tiempos de sangrado, incluso cuando está presente la proteína  $G\alpha_q$  endógena, sugiriendo una competición con la proteína  $G\alpha_q$  endógena actuando como dominante negativo o alterando el balance entre vías de señalización por  $G\alpha_q$ .



- Menores tiempos y volúmenes de sangrado
- Formación de trombos



- Mayores tiempos y volúmenes de sangrado
- Menor formación de trombos

**Figura D1. Modelo para el posible papel de la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha_q$  en la hemostasis vascular.**

Durante los procesos de daño vascular se produce una activación del complemento que provoca un incremento de la producción de trombina dentro de los vasos sanguíneos dando lugar al reclutamiento de plaquetas y activación del endotelio. Para que este reclutamiento y activación del endotelio ocurra de manera adecuada, tanto las células endoteliales como las plaquetas se activan en respuesta al ligando trombina a través de sus receptores PAR-1 acoplados a  $G\alpha_q/11$ . En el caso de las células endoteliales la trombina produce un incremento de la expresión de vWF en su superficie, que permite la adhesión de las plaquetas. En cuanto a las plaquetas, la activación por trombina permite un incremento en la secreción de ADP y tromboxano 2A (Tx2A), además de cambios en la morfología plaquetaria. Tanto la delección endotelial de  $G\alpha_q/11$  como la expresión de  $G\alpha_q$  mutado en la región de interacción con dominios PB1 resultan en un incremento de los volúmenes y tiempos de sangrado.

Puesto que los ratones HA- $G\alpha_q$ -PB1 mut KI expresan esta proteína de forma global, su efecto podría ser debido tanto a su acción en las propias células endoteliales como en las plaquetas (ver Fig. D1). El incremento observado en los tiempos de sangrado se asemeja al que se ha descrito en ratones que no presentan  $G\alpha_q$  en las plaquetas, en los que se observa una hemostasis primaria fallida (Offermanns et al., 1997). Además, el patrón de *re-bleeding* que observamos en ratones HA- $G\alpha_q$ -PB1 mut KI es un fenómeno característico cuando la acción hemostática de las plaquetas está parcialmente inhibida, dando lugar a una mala adhesión del trombo a la pared del vaso (André et al., 2003; Liu et al., 2012). Los GPCRs acoplados a  $G\alpha_q$ , PAR-1 y PAR-4, son esenciales para el reclutamiento y agregación de las plaquetas tras el tratamiento *in vivo* con trombina (Coughlin, 2005; Cornelissen et al., 2010; Posma et al., 2019). Por otra parte, tanto la ausencia de  $G\alpha_q$  en las células endoteliales como la expresión de un mutante que no pueda interaccionar con ciertos efectores impediría la correcta señalización de estos GPCRs tras su activación por trombina, que serían los responsables de promover la secreción de vWF y P-selectina, provocando la agregación de las plaquetas en la región dañada de los vasos sanguíneos (Cleator et al., 2006; Gumundsdottir et al., 2008). La secreción de vWF por las células endoteliales es esencial para la hemostasis y la trombosis. Ratones deficientes en  $G\alpha_q/11$  en las células endoteliales presentan una reducción de la secreción de vWF en respuesta al péptido activador de PAR-1 provocando una menor adhesión de plaquetas a las células endoteliales (Rusu et al., 2014).

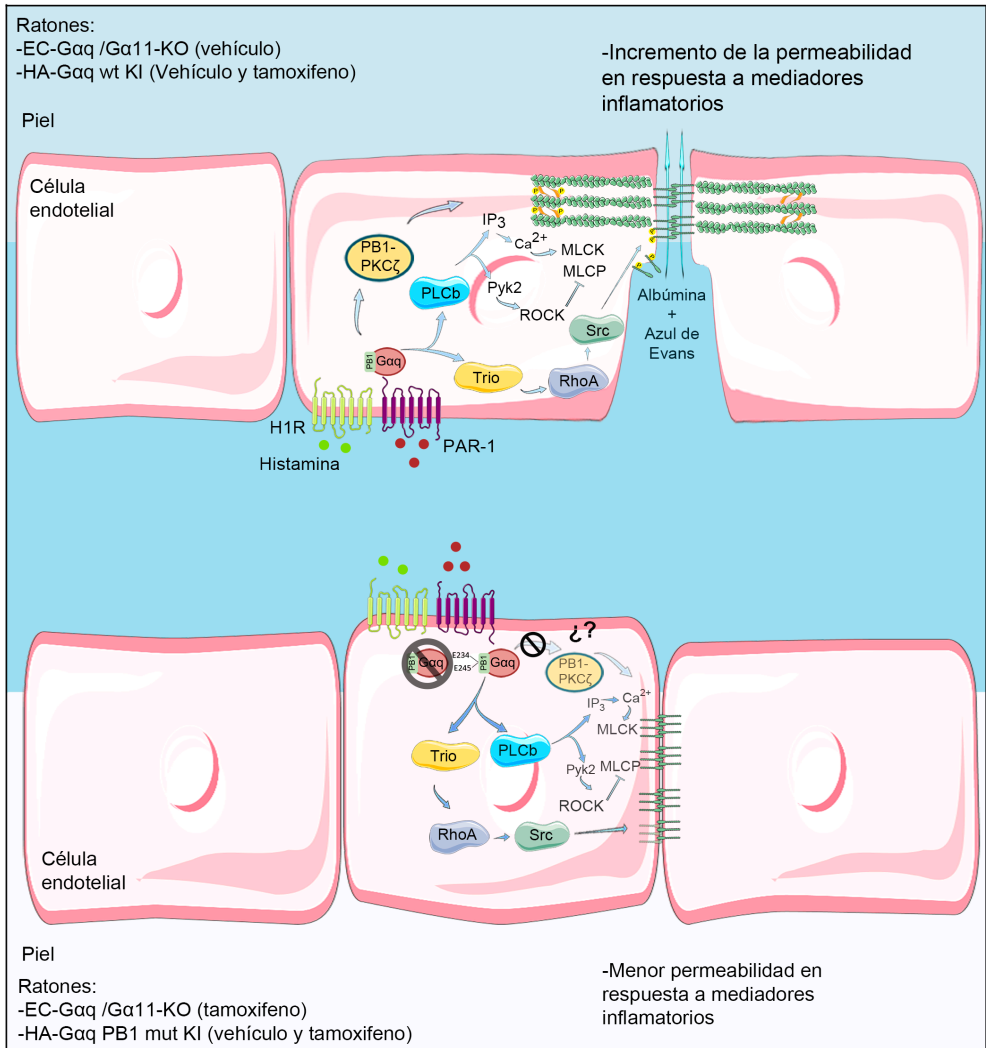
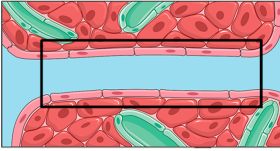
En resumen, nuestros datos sugieren que la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha_q$  desempeña una función relevante en el control de la hemostasis. Puesto que la activación de la coagulación y la modulación negativa de la fibrinólisis son características esenciales de la condición proinflamatoria en la sepsis, estos efectos pueden ser también relevantes en los contextos fisiopatológicos que discutiremos más adelante.

## La región de interacción con dominios PB1 de $G\alpha_q$ en el control de la permeabilidad del endotelio

El mantenimiento del endotelio vascular como una barrera semipermeable es sumamente importante para controlar el paso de macromoléculas y fluidos entre la sangre y el espacio intersticial. La permeabilidad vascular puede estar incrementada por varios factores, como puede ser VEGF (del inglés, “vascular endothelial growth factor”) o numerosos mediadores inflamatorios. Los mecanismos de señalización que intervienen difieren entre VEGF, que activa a receptores tirosina quinasa, y los mediadores inflamatorios como histamina, bradiquinina o trombina que actúan a través de GPCRs (Wettschureck & Offermanns, 2005; Wettschureck et al., 2019). Los GPCRs de estos mediadores están acoplados a proteínas  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ , que promueven la activación de las vías canónicas de señalización a través de  $PLC\beta$  o pueden activar otras vías a través de los efectores Trio/RhoA (ver Introducción) (Wettschureck & Offermanns, 2005; Mikelis et al., 2015; Sivaraj et al., 2015). Por otro lado, existe una regulación de la permeabilidad vascular mediada por proteínas que poseen dominios PB1, como es el caso de  $PKC\zeta$  (Burke & Berk, 2015).  $PKC\zeta$  es capaz de potenciar la permeabilidad vascular desestabilizando las uniones estrechas del endotelio tras su activación por el factor de crecimiento VEGF (J. H. Kim et al., 2014). En nuestro laboratorio se ha descrito a  $PKC\zeta$  como un nuevo efector de  $G\alpha_q$  a través de su interacción mediante dominios PB1 (Sánchez-Fernández et al., 2014, 2016), lo que podría tener un papel relevante en la regulación de la permeabilidad vascular.

Nuestros resultados muestran que, tal como ocurre con la eliminación específica de  $G\alpha_q$  en endotelio, la expresión de HA- $G\alpha_q$  mutada en el dominio de interacción PB1 causa una reducción drástica de la respuesta a agentes promotores de la permeabilidad vascular, lo que equivaldría a prevenir la pérdida de la función de barrera endotelial inducida por varios mediadores inflamatorios, como la histamina o el ligando de PAR1. Otros autores han mostrado que las respuestas a histamina y al péptido activador de PAR-1 están impedidas en ratones en ausencia de  $G\alpha_q$ , previniendo así la apertura de la barrera endotelial (Korhonen et al., 2009; Mikelis et al., 2015). Todo ello evidencia que las vías de señalización estimuladas por  $G\alpha_q$  a través de su región interactora con proteínas que presentan dominios PB1 son necesarias para la modulación de la permeabilidad vascular. Además, cabe destacar que, al igual que ocurriría en el proceso de hemostasis, la simple expresión “per se” del mutante de  $G\alpha_q$  causa una moderada reducción de la permeabilidad inducida por histamina o el péptido activador de PAR-1, sugiriendo que puede actuar

como dominante negativo sobre la función de la proteína endógena, quizá alterando el balance entre vías de señalización por  $G\alpha_q$  o su interactoma integrado.



**Figura D2. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha_q$  en la permeabilidad vascular.**

En la barrera endotelial, mediadores inflamatorios como el ligando de PAR-1 o histamina son capaces de activar distintos GPCRs acoplados a  $G\alpha_q$ , como PAR-1 o H1, respectivamente. La activación del efector clásico de  $G\alpha_q$ ,  $PLC\beta$ , provoca la estimulación de la quinasa de la cadena de la miosina ligera (MLCK, del inglés “Myosin Light Chain Kinase”), además de la inhibición de la fosfatasa de la cadena de la miosina ligera (MLCP, del inglés “Myosin Light Chain Phosphatase”) que promueve la contracción de la actinmiosina. Además de la vía clásica de  $PLC\beta$ , existen mecanismos de señalización alternativos a través de la vía  $G\alpha_q/11/Trio/RhoA/Src$ , permitiendo la relocalización de los complejos de adhesión de VE-cadherina a las uniones focales adherentes y potencialmente de la vía  $G\alpha_q/PKC\zeta$ , aumentando la permeabilidad endotelial. Los ratones con delección endotelial de  $G\alpha_q/11$  o que expresan  $G\alpha_q$  mutado en la región de interacción con dominios PB1 presentan una disminución de la apertura de la barrera endotelial.

Es tentador sugerir que la funcionalidad alterada del mutante  $G\alpha_q$ -mut PB1 esté relacionada con un impedimento de la señalización dependiente de su interacción con  $PKC\zeta$ . Como hemos comentado anteriormente,  $PKC\zeta$  está implicada en el incremento de la permeabilidad vascular, tanto a nivel directo con la desestabilización de las uniones estrechas del endotelio vascular como a nivel indirecto a través del incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”) o de la inflamación (Wilson et al., 2003; Kim et al., 2012; J. H. Kim et al., 2014), por lo que puede ser un buen candidato para explicar los resultados obtenidos. Mientras que  $G\alpha_q$  wt sería capaz de estimular de manera coordinada tanto la vía clásica de activación de  $PLC\beta$ , el mecanismo alternativo a través de los efectores Trio y RhoA (Wettschureck & Offermanns, 2005; Mikelis et al., 2015; Sivaraj et al., 2015), o la rama PB1/  $PKC\zeta$ , el mutante sería incapaz de promover esta última, promoviendo un desbalance o sesgo en la señalización, tanto en ausencia como en presencia de la proteína endógena (Fig.D2). Sin embargo, no cabe descartar que otras interacciones de  $G\alpha_q$  dependientes del dominio de interacción con PB1 estén también implicadas. Por todo ello, juzgamos de interés evaluar la funcionalidad de este mutante en modelos fisiopatológicos que afectan la funcionalidad vascular, como las situaciones de sepsis.

### **Implicaciones funcionales de la región de interacción con dominios PB1 de $G\alpha_q$ en modelos de sepsis y daño agudo pulmonar inducido por LPS**

El proceso de sepsis es una respuesta sistémica a las infecciones. Sus signos y síntomas son producidos por la activación de los mecanismos de defensa del huésped. En la sepsis se produce una inflamación sistémica debido a la liberación de un gran número de mediadores inflamatorios, citoquinas, quimioquinas y productos del sistema del complemento que activan a las células endoteliales (Schouten et al., 2008; Chichger, Rounds, & Harrington, 2019). En consecuencia, uno de los signos más destacados de



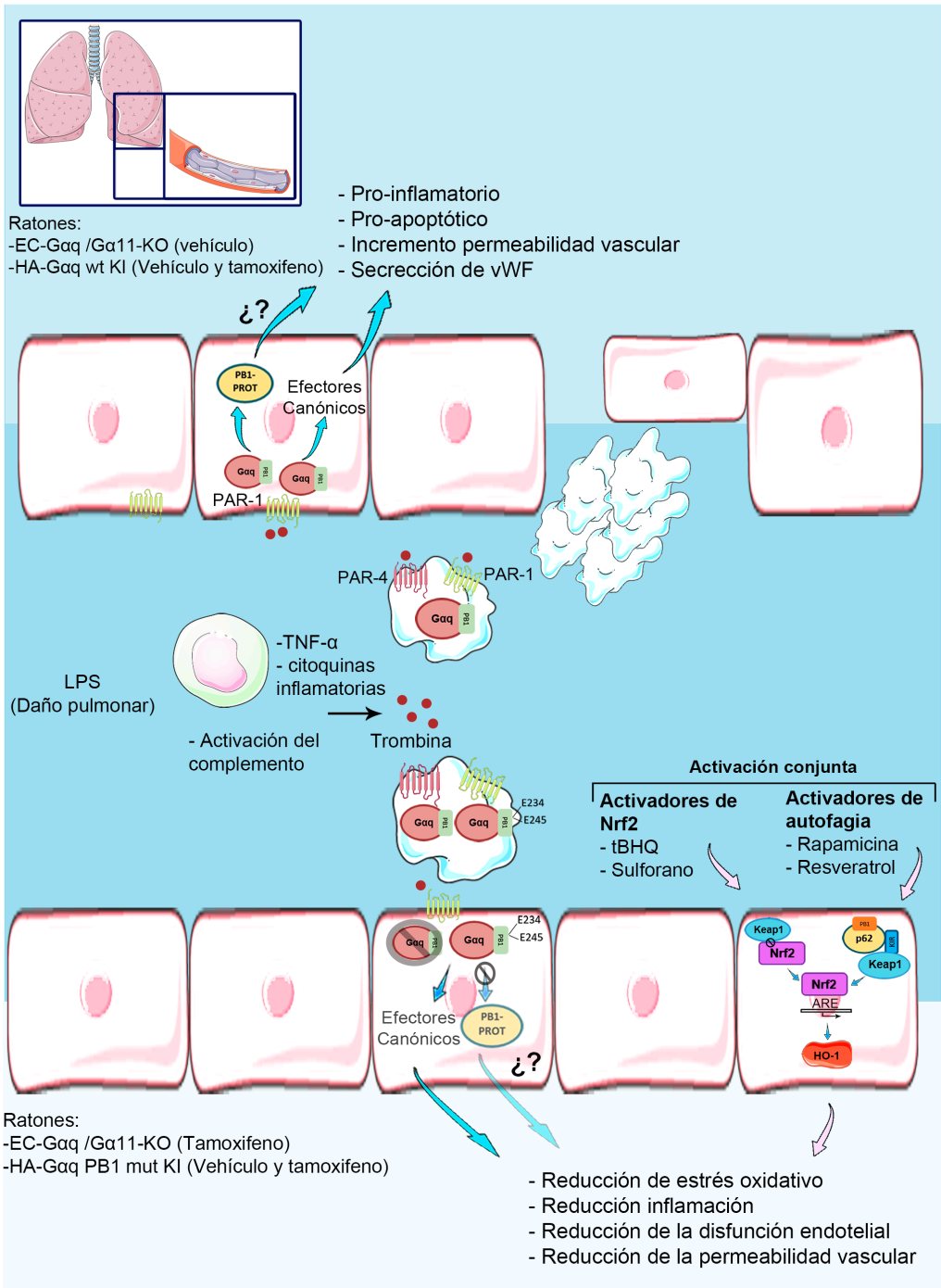
la sepsis es la disfunción microvascular que puede afectar a distintos órganos (Gill et al., 2015). Uno de los primeros órganos en verse afectado es el pulmón, llegando a provocar un síndrome conocido como daño agudo pulmonar. Entre las principales características patológicas de este síndrome se encuentra la hiper-permeabilidad endotelial que promueve inflamación y daño pulmonar (Johnson & Matthay, 2010). La circulación de LPS o endotoxinas produce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6 que activan el complemento generando trombina (Schouten et al., 2008; Alberelli & De Candia, 2014).

Nuestros estudios muestran que la delección de la proteína G $\alpha$ q endotelial endógena da lugar a una reducción de la extravasación de colorante al pulmón al provocarles daño agudo pulmonar mediante el tratamiento con LPS, lo que sugiere que G $\alpha$ q tiene un papel promotor del edema pulmonar en esas condiciones experimentales. Por el contrario, la expresión “extra” de G $\alpha$ q en los animales knock-in HA-G $\alpha$ q wt KI en condiciones de no eliminación de la proteína endógena presentaban una mayor extravasación en respuesta a LPS, coherente de nuevo con un papel facilitador de G $\alpha$ q en la producción de edema pulmonar por LPS. Para promover este efecto, parece necesaria la participación de un componente de señalización de G $\alpha$ q/proteínas PB1, ya que los animales HA-G $\alpha$ q-PB1-mut KI presentan una extravasación significativamente menor que los animales EC-G $\alpha$ q KO o HA-G $\alpha$ q wt KI, incluso en condiciones de no eliminación de la proteína endógena, lo que apunta también a que HA-G $\alpha$ q-PB1-mut actúa como dominante negativo sobre la función de la proteína G $\alpha$ q endógena.

Este patrón de respuesta es coherente en líneas generales con los resultados obtenidos en ensayos de permeabilidad vascular en el apartado anterior. En respuesta al medio pro-inflamatorio y pro-trombótico promovido por LPS (Schouten et al., 2008; Alberelli & De Candia, 2014) (ver Fig.D3), los ratones wild-type control (y, de forma más exacerbada, los que expresan una dosis extra de HA-G $\alpha$ q wt KI) dispondrían en sus células endoteliales de G $\alpha$ q capaz de activar coordinadamente tanto efectores canónicos como PLC $\beta$ , Trio o RhoA (Wettschureck & Offermanns, 2005; Mikelis et al., 2015; Sivaraj et al., 2015), así como vías G $\alpha$ q/PB1 como la PKC $\zeta$ . Sin embargo, la señalización en ratones con el mutante HA-G $\alpha$ q-PB1-mut estaría alterada, al no poder activar estas ramas específicas de acción de forma balanceada. Además de las células endoteliales, no cabe descartar que en el fenotipo de estos ratones influyan acciones derivadas de la expresión general de este mutante en otros tipos celulares.

La hiper-estimulación de GPCRs acoplados a Gq se ha relacionado con procesos de inflamación, apoptosis, trombosis y disfunción endotelial. En respuesta a trombina, el GPCR acoplado a Gαq, PAR-1, provoca un aumento de la respuesta pro-inflamatoria, un incremento de la permeabilidad y mayor reclutamiento de plaquetas y leucocitos (Schouten et al., 2008; Alberelli & De Candia, 2014). Sin embargo, animales deficientes en PAR-1 y PAR-2 no se encuentran protegidos contra la septicemia en modelos de endotoxemia en ratón, aunque la combinación de un inhibidor de trombina, hirudina, redujo la inflamación y su mortalidad en ratones deficientes en PAR-1 y PAR-2 (Pawlinski et al., 2004). La hiper-activación de los receptores AT1 acoplados a Gq por Angiotensina II tiene también notables efectos en la producción de estrés oxidativo, inflamación y edema pulmonar, lo que se ha puesto especialmente de manifiesto en el contexto de la infección por SARS-Cov2 (Brojakowska et al., 2020; Costa et al., 2020; Gheblawi et al., 2020).

En lo que respecta a un posible papel de vías Gαq/PB1 en contextos de daño agudo pulmonar, existen evidencias *in vitro* de que la activación de PKCζ a través de diferentes estímulos proinflamatorios (TNFα, trombina) provoca una permeabilidad excesiva que es efectivamente recuperada con la inhibición o supresión de PKCζ (Aveleira, Lin, Abcouwer, Ambrósio, & Antonetti, 2010; Minshall et al., 2010; J. H. Kim et al., 2014). También se ha observado que la apoptosis de las células endoteliales depende de la fosforilación de NF-κB por PKCζ (específicamente al residuo S311) (Duran et al., 2003). El papel de PKCζ en la activación de vías apoptóticas en células endoteliales se ha sugerido también en otro estudio en el que la inhibición de la interacción entre PKCζ y p62 a través de sus dominios PB1 reduce la activación de JNK/caspasa3 y disminuye inflamación y apoptosis (Kim et al., 2012). La apoptosis de las células endoteliales microvasculares de pulmón se correlaciona con disfunción microvascular pulmonar séptica y daño agudo pulmonar (Gill et al., 2015). Dada la interacción descrita por nuestro grupo entre Gαq y PKCζ, que inducía muerte celular por apoptosis en condiciones de estrés de nutrientes en células modelo (Sánchez-Fernández et al., 2016), resulta tentador sugerir que la delección de Gαq o la mutación en su región de interacción con dominios PB1 en las células endoteliales de pulmón impediría esta vía y prevendría ciertos aspectos de la disfunción microvascular pulmonar por este mecanismo.



**Figura D3. Papel de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq en condiciones de sepsis y daño agudo pulmonar.**

Cuando el LPS invade el torrente sanguíneo induce procesos de sepsis y produce daño agudo pulmonar. La activación sistémica de la inflamación conduce a la liberación de citoquinas por los monocitos (TNF $\alpha$  o IL-6) y a la activación del complemento, que incrementará los niveles de trombina. La activación de PAR-1 endotelial por trombina induce el incremento de la permeabilidad endotelial, aumento de la respuesta proinflamatoria, apoptosis y liberación de factor de von Willebrand (vWF). La liberación de vWF por las células endoteliales promoverá la agregación plaquetaria y formación de trombos. En los animales que presentan delección endotelial de G $\alpha$ q/11 o expresan G $\alpha$ q mutado en la región de interacción con dominios PB1 se observa una reducción de la permeabilidad endotelial. El efecto “protector” de estas alteraciones en la señalización por G $\alpha$ q sería similar al de moléculas activadoras de la vía de Nrf2 (tBHQ, sulforano) o de autofagia (rapamicina, resveratrol) que convergen en la activación de genes de respuesta antioxidante a través de elementos ARE (del inglés “Antioxidant Response Elements”) como la oxidasa HO-1, que confiere protección frente al daño agudo pulmonar. Todo ello sugiere posibles relaciones funcionales de G $\alpha$ q con esos procesos celulares.

En nuestro modelo in vivo hemos estudiado también el impacto en las distintas líneas de ratones del tratamiento con tBHQ, potente activador de Nrf2, que protege frente al daño pulmonar inducido por LPS en modelos de ratón de daño agudo pulmonar (Wei et al., 2018). El distinto impacto relativo de este tratamiento, claramente observable en ratones EC-G $\alpha$ q KO, menor en animales HA-G $\alpha$ q wt KI y no aparente en ratones *knock-in* HA-G $\alpha$ q-PB1-mut KI (que ya presentaban per se bajos niveles de edema) sugería también algún tipo de relación moduladora con la vía tBHQ/Nrf2. Por ello, como se discute en secciones posteriores, se exploró la posible concurrencia de otros mecanismos relacionados con la regulación por vías G $\alpha$ q/PB1 de procesos de autofagia o estrés oxidativo.

### Otros fenotipos relacionados con la falta de interacción de G $\alpha$ q con proteínas que presentan dominios PB1

En este trabajo, además del estudio de la función endotelial discutido anteriormente, se observaron una serie de particularidades fenotípicas en los ratones que portan G $\alpha$ q mutado en la región de interacción con dominios PB1, relacionadas con problemas de fertilidad y la aparición de prolapsos rectales.

Los animales HA-G $\alpha$ q-PB1 mut KI presentaban menor número de partos en el periodo de seguimiento y menor número de crías por parto en comparación con las otras líneas de ratones. Estudios previos indican la eliminación de G $\alpha$ q/11 en células de la granulosa promueve en las hembras problemas de subfertilidad (reducción del 50% en la ovulación y reducción del 85% en el número de crías acumuladas), así como defectos en la ruptura folicular (ovulación) debido a fallos de señalización en el

receptor de la hormona luteinizante, encargado de inducir el receptor de progesterona que, como resultado final, produce la ruptura folicular (Breen et al., 2013). Por otra parte, la activación de  $G\alpha q/11$  en el cuerpo lúteo de ratón se requiere para el parto (Mejia, Waite, & Ascoli, 2015). Además de los problemas relacionados directamente con el sistema reproductor, se ha descrito que la eliminación específica de  $G\alpha q/11$  en neuronas liberadoras de la hormona gonadotropina (reguladoras maestras de la fertilidad) producía la inactivación parcial del eje neuroendocrino reproductivo tanto en ratones macho como hembras (Babwah et al., 2015). Estos resultados sugieren un importante papel de la vía  $G\alpha q/proteínas PB1$  en el control de la reproducción, aunque el tipo celular y los mecanismos concretos están por aclarar.

La línea de ratones HA- $G\alpha q$ -PB1 mut KI se caracteriza también por la aparición de prolapsos rectales a partir de los tres meses de vida en cerca del 25% de los animales, con aproximadamente el 80% de los casos en hembras. Se ha descrito que la vía mediada por  $G\alpha q/11$  juega un papel fundamental en la preservación de la homeostasis intestinal, especialmente en la maduración y posicionamiento de las células de Paneth, células epiteliales especializadas localizadas en la base de las criptas del intestino delgado que contribuyen a la defensa frente a patógenos. Estos problemas en las células de Paneth derivaban en una mayor susceptibilidad a la colitis y una mayor inflamación (Watanabe et al., 2016; Mashima et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo son muy preliminares, pero sugieren que la vía  $G\alpha q/proteínas PB1$  media acciones de GPCRs implicados en la homeostasis de la funcionalidad intestinal.

### **Mecanismos moleculares implicados en la modulación de la vía de señalización mTORC1/autofagia a través de $G\alpha q/11$**

La modulación metabólica de la autofagia está orquestada principalmente por el equilibrio entre las contribuciones opuestas proporcionadas por las vías mTORC1 (negativa) y AMPK (positiva) (Jewell & Guan, 2013; Saxton & Sabatini, 2017). En este trabajo hemos contribuido a desvelar un papel de  $G\alpha q/11$  como regulador clave del proceso de macroautofagia a través de la modulación del complejo de señalización de mTORC1. En un trabajo de Tesis previo en el laboratorio (Cabezudo, 2018; Cabezudo et al., 2020, en revisión) habíamos descrito que células MEF que carecen de  $G\alpha q/11$  muestran una menor activación de mTORC1 y mayor autofagia basal, así como una inactivación más temprana y sostenida de esta vía, que va paralela a una inducción de autofagia más temprana y prolongada, tras la eliminación del suero o en ausencia de aminoácidos o glucosa, en comparación con las células MEF wt. Además, las células

deficientes en Gαq/11 tampoco eran capaces de inactivar la autofagia en respuesta a la reposición de nutrientes (Cabezudo et al., 2020, en revisión). Estos datos sugieren que Gαq actúa como un modulador general de la señalización de mTORC1 y del proceso de autofagia, en respuesta a fluctuaciones de diferentes tipos de nutrientes.

p62/SQSTM1 es una proteína multifuncional que incluye dominios PB1 y que juega un papel muy importante en la regulación de la autofagia, presentando una gran variedad de ubicaciones subcelulares, entre las que se encuentran autofagosomas y lisosomas (Moscat, Karin, & Diaz-Meco, 2016; Sánchez-Martín & Komatsu, 2018). En esta Tesis hemos contribuido a esclarecer el papel de p62 como efector de Gαq/11 conectando con el estado de activación de mTORC1. En primer lugar, p62, mTOR, Raptor y Gαq están presentes en el mismo complejo multimolecular en MEFs en condiciones endógenas en presencia de nutrientes, mientras que las células que carecen de Gαq muestran una presencia reducida de p62 en los inmunoprecipitados de mTOR y Raptor junto con una disminución de la activación de la vía mTORC1. En segundo lugar, p62 muestra la mayoría de las características de un auténtico efector de Gαq, como son la asociación de proteínas endógenas, la interacción mejorada tras la activación de Gαq y la competencia con otros interactores conocidos de Gαq como GRK2 en la interacción Gαq/p62 (Cabezudo et al., 2020, en revisión). Gαq y p62 parecen asociarse a través del dominio PB1 de p62 y de la región de interacción con dominios PB1 de Gαq, diferente de la región de interacción involucrada en la asociación de Gαq con los efectores canónicos, PLCβ o p63RhoGEF. Nuestros resultados muestran una clara disminución de la asociación de mTOR y p62 con el mutante de Gαq que no puede interactuar con dominios PB1, en comparación con la asociación observada en presencia de la proteína Gαq wt, poniendo de manifiesto que la región de interacción con dominios PB1 de Gαq es necesaria para la formación de un complejo entre mTOR, p62 y Gαq. Finalmente, hemos observado una disociación progresiva entre Gαq y p62 tras privación de suero, y resultados similares se han observado en ausencia de aminoácidos o de glucosa (Cabezudo, et al., 2020, en revisión). Además, la recuperación de aminoácidos después de la privación de nutrientes restaura la co-inmunoprecipitación endógena de Gαq/p62/mTOR en células MEFs wt, como indican los resultados de nuestro grupo (Cabezudo et al., 2020, en revisión). Se ha descrito que la interacción de p62 (a través de regiones diferentes de su dominio PB1) con Raptor y Rags, conduce a la translocación de mTOR al lisosoma y a la estabilización de los heterodímeros activos RagB-GTP/RagC-GDP (Duran et al., 2011). Por tanto, nuestros resultados apuntan a que la asociación de Gαq a p62 ayudaría a orquestar un complejo mTOR/Raptor/p62/

Rag completamente activo. Por otro lado, resultados previos obtenidos en el laboratorio mostraban que el inhibidor de Gαq/11, YM-254890, previene la reactivación completa de la vía mTORC1 tras la recuperación de aminoácidos en células MEFs WT (Cabezudo et al., 2020, en revisión). En un modelo más fisiológico, hemos observado que el inhibidor de Gαq/11, YM-254890, es capaz de inhibir el estado activado de la vía mTORC1 en explantes de hígado derivados de ratones alimentados con dieta normal, de forma similar al observado en presencia del conocido inhibidor de mTOR, rapamicina, coherente de nuevo con un papel de Gαq/11 en el control de la vía de mTORC1.

En resumen, podemos postular que en condiciones en las que hay disponibilidad de nutrientes se favorece la interacción entre Gαq y p62 contribuyendo a la activación del complejo mTORC1 y a la preservación de niveles bajos de autofagia homeostática. Sin embargo, en situación de privación de nutrientes, la disociación de Gαq y p62 facilitaría la participación de p62 en autofagia a través de su dominio PB1 (Sánchez-Martín & Komatsu, 2018). La recuperación de nutrientes tras el proceso de autofagia favorecería la re-formación del complejo mTOR, p62 y Gαq y el control del proceso autofágico.

### **Mecanismos moleculares implicados en la modulación de la respuesta antioxidante de Nrf2 a través de Gαq**

Además del importante papel que juega en la regulación de la autofagia, p62 también está implicado muchos otros procesos fisiopatológicos, incluyendo envejecimiento/senescencia, cáncer, enfermedades hepáticas, enfermedades pulmonares y enfermedades cardiovasculares (Yang & Klionsky, 2010), y en los mecanismos que regulan el estrés oxidativo (Nezis & Stenmark, 2012; Filomeni, De Zio, & Cecconi, 2015; Katsuragi et al., 2015). Como ya se describió en la introducción, p62 es capaz de modular la respuesta al estrés oxidativo a través de la regulación de la proteína Nrf2 (Jain et al., 2010, Taguchi et al., 2012, Jain et al., 2015). En concreto, p62 es capaz de asociarse con Keap1 a través de su dominio de interacción con Keap1 (KIR) (Taguchi et al., 2012). Esta asociación de p62/Keap1 permite liberar a Nrf2 de Keap1 y translocarse al núcleo donde activará la respuesta antioxidante (Komatsu et al., 2010; Taguchi et al., 2012). Parece existir una estrecha y compleja conexión entre los procesos de autofagia y la regulación del estrés oxidativo. Así, el complejo mTORC1 es capaz de fosforilar a p62 en su dominio KIR en condiciones de estrés, provocando un incremento de su asociación con Keap1 y la liberación translocación al núcleo de Nrf2, que además de activar genes antioxidantes



también aumenta los niveles de p62 (Ichimura et al., 2013).

En este contexto, nos preguntamos si la asociación  $G\alpha q$ /p62 y/o la funcionalidad de  $G\alpha q$  podrían afectar la regulación del estrés oxidativo y de las vías protectoras que dependen de la activación de Nrf2.

Hemos observado que las células MEFs sin  $G\alpha q/11$  o que expresan de manera estable  $G\alpha q$ -EEAA KI, mutada en la región de interacción con dominios PB1, presentaban unos niveles exacerbados de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como un incremento en la traslocación nuclear de Nrf2 y en los niveles basales de su gen diana HO-1 (Loboda, Damulewicz, Pyza, Jozkowicz, & Dulak, 2016). Esta situación basal de activación de respuesta antioxidante, quizá como adaptación a los altos niveles de ROS, reduce en estas células el rango de respuesta a tratamiento con tBHQ.

Estos datos sugieren que una  $G\alpha q$  plenamente funcional es relevante para la homeostasis de ROS. Las características fenotípicas de las células  $G\alpha q/11$  KO y  $G\alpha q$ -EEAA KI en parámetros de estrés oxidativo se dan en el contexto paralelo al incremento que poseen ambas líneas en los niveles de autofagia basal (Cabezudo et al, 2020, en revisión). Dadas las complejas relaciones mutuas entre autofagia y estrés oxidativo discutidas más arriba, es tentador sugerir que un interactoma alterado de  $G\alpha q$  podría alterar el balance de uno o de ambos procesos, que a su vez se retroalimentarían (Taguchi et al., 2012).

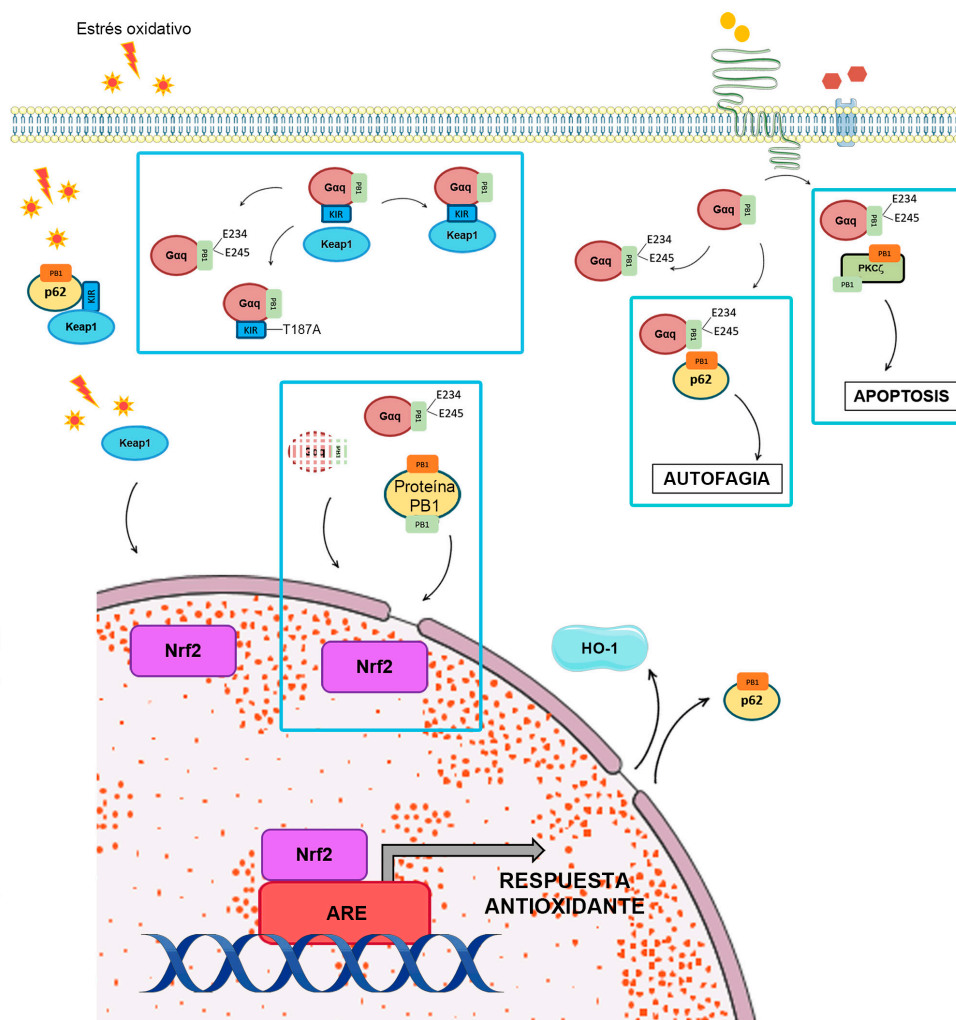
Por tanto, dada la interacción de  $G\alpha q$  con p62 a través de dominios PB1, nos preguntamos si  $G\alpha q$  podría estar involucrado en la modulación de los complejos p62/Keap1/Nrf2, lo que nos ha llevado a identificar a Keap1 como posible nuevo efector de  $G\alpha q$  en un contexto de estrés oxidativo.

Nuestros datos muestran que  $G\alpha q$  se asocia de manera endógena con Keap1, que la interacción se potencia con la activación de  $G\alpha q$  y que el complejo  $G\alpha q$ /Keap1 se disocia en presencia de GRK2, un interactor establecido y regulador negativo de la señalización dependiente de  $G\alpha q$  (Carman et al., 1999). Todas estas características son comunes a los efectores de  $G\alpha q$ . Es interesante que  $G\alpha q$ , p62 y Nrf2 parecen coexistir en inmunoprecipitados de Keap1 y que la asociación  $G\alpha q$ /Keap1 parece tender a disminuir tras tratamientos prolongados con tBHQ.

Las subunidades  $G\alpha q$  pueden interaccionar con proteínas efectoras diferentes de la cascada de señalización canónica PLC $\beta$  para modular procesos celulares complejos (Lutz et al., 2007; Vaqué et al., 2013; Sánchez-Fernández et al., 2016). Todos los efectores de



las subunidades  $G\alpha$  se asocian con la región comprendida en la mitad de la hélice  $\alpha 2$ , junto con la hélice  $\alpha 3$  y su unión con la lámina  $\beta 5$ , aunque los aminoácidos específicos para estas interacciones varían en función del efector específico (Sprang et al., 2007). La región de interacción con dominios PB1 de  $G\alpha q$  se encuentra cercana al área de unión de efectores canónicos, pero implica un subconjunto de residuos de aminoácidos clave diferentes a los requeridos para la unión con otros efectores/moduladores de  $G\alpha q$  (PLC $\beta$ , p63RhoGEF, GRK2) (ver Fig. I2).



**Figura D4. Modelo de interactoma de  $G\alpha q$  dependiente de la región de interacción con dominios PB1 y del motivo pseudo-KIR.** Representación gráfica de las diferentes asociaciones de  $G\alpha q$  a través de las nuevas interacciones descritas por nuestro grupo, que aparecen resaltadas por un recuadro azul. Se muestran las posibles vías de señalización reguladas por estas nuevas regiones de interacción de  $G\alpha q$ .

Nuestros resultados indican que las mutaciones de Gαq que alteran la unión con PLCβ, efector canónico, no afectaron negativamente a su asociación con Keap1. Puesto que Gαq, p62 y Keap1 co-inmunoprecipitan, podría especularse que se encuentran dentro de un mismo complejo ternario, en el que p62 actuase de intermediario, por su doble capacidad de unirse a Gαq por su dominio PB1 y a Keap1 por su dominio KIR (Komatsu et al., 2010; Ichimura et al., 2013). El motivo KIR de p62 permite la interacción directa con Keap1 de una manera similar a la que lo hace Nrf2 con Keap1, y con afinidades parecidas (Komatsu et al., 2010; Lau et al., 2010). Sin embargo, observamos que la asociación entre Gαq y Keap1 no desaparece por completo al mutar la región de interacción con dominios PB1 de Gαq, sugiriendo un escenario más complejo y la posible existencia de una región de interacción directa entre ambas que no dependiese de la interacción a través de estos dominios.

El análisis detallado de la secuencia de Gαq nos reveló la existencia solo en la familia de proteínas Gαq/11 de una región con una elevada homología con el motivo KIR de p62, compartiendo unos residuos esenciales (P350, T352, G353) para la capacidad de interacción de p62 con Keap1 (Komatsu et al., 2010). La mutación de estos residuos de Gαq inhibe apreciablemente la asociación de Keap1 y Gαq.

En resumen, nuestros resultados sugieren la existencia de una nueva región de interacción de Gαq con Keap1 similar al motivo KIR de p62. Sin embargo, dado que los mutantes de interacción Gαq/PB1 también muestran una menor asociación a Keap1, se necesita profundizar en el posible papel que podría tener Gαq en el control mutuo de los complejos p62/Keap1 y Keap1 y Nrf2, o la presencia de complejos multimoleculares más complejos, así como explorar la relación funcional entre p62 y Gαq/Keap1 en la activación de las respuestas antioxidantes mediadas por Nrf2.

### **Posibles implicaciones fisiopatológicas del nuevo interactoma de Gαq**

El conjunto de nuestros resultados plantea muchas preguntas de interés que se deberán abordar en estudios futuros. Nuestros estudios *in vivo* en las nuevas líneas de ratón generadas refuerzan el importante papel de la señalización mediada por Gαq en el control de la hemostasis y la permeabilidad vascular en respuesta a mediadores inflamatorios, lo que podría ser particularmente relevante en contextos de disfunción endotelial y modelos de daño agudo pulmonar inducidos por LPS. Desde el punto de vista de mecanismos, nuestro trabajo desvela que un componente de señalización de Gαq/proteínas PB1 desempeña un papel esencial en estos contextos fisiopatológicos.

Como se ha discutido en apartados anteriores, la vía  $G\alpha q/PB1/PKC\zeta$  podría tener un papel importante en esos contextos a través del control de procesos inflamatorios y de apoptosis. Alternativamente, la modulación por  $G\alpha q$  de procesos de autofagia a través de interacciones  $G\alpha q/PB1/p62$  o de la respuesta antioxidante a través de su compleja interacción con Keap1/Nrf2, podrían estar implicadas en la modulación del edema pulmonar inducido por LPS, y explicar el fenotipo observado en ratones que carecen de  $G\alpha q$  o expresan en su lugar el mutante en interacción con dominios PB1.

Se han observado procesos de autofagia alterados en numerosas enfermedades tanto pulmonares como vasculares (Ornatowski et al., 2020). Se ha descrito relación del proceso de autofagia con la integridad de la barrera endotelial tras la inducción de daño pulmonar por LPS (Zhang et al., 2018) y activación de autofagia en contextos de daño agudo pulmonar por LPS o sepsis (Wang et al., 2019) aunque otros estudios son contradictorios (Yen et al., 2013).

Por otra parte, como ya hemos comentado, existen numerosas evidencias de interrelación entre la autofagia y la homeostasis redox. La liberación de ROS juega un papel importante en la activación de la autofagia que, a su vez, ayuda a reducir los niveles de ROS, evitando sus efectos tóxicos y manteniendo la homeostasis celular (Fang, Gu, Smerin, Mao, & Xiong, 2017). La alteración de la homeostasis mitocondrial contribuye al incremento de ROS, pero también a activar autofagia para proteger la supervivencia celular, degradando a las mitocondrias dañadas que son una significativa fuente de estrés oxidativo (Dutta, Calvani, Bernabei, Leeuwenburgh, & Marzetti, 2012). En este sentido, recientemente, se ha descrito la localización de las proteínas  $G\alpha q/11$  en las mitocondrias donde desempeñan un papel importante en la función mitocondrial, regulando el balance entre fusión y fisión (Benincá et al., 2014). El incremento en la activación de Nrf2 juega igualmente un papel muy importante en la disminución de estrés oxidativo e inflamación en condiciones de daño agudo pulmonar (Chan & Kan, 1999).

Es posible aventurar que, en el contexto de daño agudo pulmonar inducido por sepsis, la carencia de  $G\alpha q$  o su sustitución por un mutante con menor capacidad de interaccionar con proteína PB1 altere el balance entre los distintos complejos multimoleculares y procesos implicados (autofagia, generación de ROS, activación de la vía Nrf2), dando lugar a una situación de menor edema.

En resumen, las proteínas señalizadoras Keap1, p62 y  $PKC\zeta$  amplían el nuevo

interactoma de G $\alpha$ q y su capacidad de interaccionar con efectores no canónicos que pueden estar involucrados en el desarrollo de ciertas patologías metabólicas, cardiovasculares y/o tumorales (Tasset and Cuervo, 2016; Chen and Maltagliati, 2018; Galluzzi et al., 2018; Racanelli et al., 2018; Chichger et al., 2019; Wang et al., 2019; Guo and Mo, 2020). Nuestros resultados abren la puerta a explorar la inhibición de G $\alpha$ q y/o de su interacción con proteínas con dominios PB1 como estrategia terapéutica en contextos de disfunción endotelial y de daño agudo pulmonar inducido por LPS.

## **CONCLUSIONES**

1. La región de interacción de Gαq con proteínas que presentan dominios PB1 es necesaria tanto para el correcto funcionamiento de la hemostasis tras daño vascular, como para incrementar la permeabilidad vascular en respuesta a ligandos asociados a GPCRs endoteliales acoplados a Gαq/11.
2. Gαq endotelial tiene un papel relevante en la producción de daño pulmonar en respuesta a mediadores inflamatorios a través de mecanismos que incluyen su interacción con proteínas con dominios PB1. La ausencia de Gαq/11 o la expresión en su lugar de un mutante incapaz de interaccionar con proteínas que contienen dominios PB1 previenen la pérdida de función de la barrera endotelial tras la inducción del daño agudo pulmonar por sepsis, protegiendo de la hiperestimulación de GPCRs acoplados a Gαq/11 y de la disfunción microvascular inducida en esas condiciones.
3. La expresión en ratones de un mutante de Gαq con una interacción deficiente con proteínas que presentan dominios PB1 afecta a su fertilidad y favorece la aparición de prolapsos rectales recurrentes.
4. La interacción de Gαq con el dominio PB1 de la proteína p62 favorece la formación dinámica de complejos multimoleculares Gαq/p62/mTOR/Raptor en presencia de nutrientes, y contribuye a la activación del complejo de señalización mTORC1 y a la consecuente inactivación del proceso de macroautofagia
5. Una Gαq plenamente funcional es relevante para la homeostasis redox de la célula, ya que la ausencia de Gαq/11 o su incapacidad de interaccionar con proteínas que contienen dominios PB1 incrementa la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una respuesta exacerbada de la vía antioxidante del factor Nrf2 en fibroblastos embrionarios de ratón.
6. Keap1, una importante proteína moduladora de Nrf2, presenta características de un efector de Gαq, y se asocia preferentemente con la forma activa de esta proteína, en un proceso que implica tanto el dominio de interacción con proteínas PB1 como una nueva “región de interacción con Keap1” (KIR) identificada en Gαq. Todo ello permite postular una compleja relación funcional entre p62, Gαq y Keap1 en la modulación de las respuestas antioxidantes mediadas por Nrf2.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Alberelli, M. A., & De Candia, E. (2014). Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascular Pharmacology*. Vascu Pharmacol. 2014 Aug;62(2):72-81. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.001>

André, P., Delaney, S. M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller B & Conley, P. B. (2003). P2Y<sub>12</sub> regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 398–406. <https://doi.org/10.1172/JCI17864>

Aveleira, C. A., Lin, C. M., Abcouwer, S. F., Ambrósio, A. F., & Antonetti, D. A. (2010). TNF- $\alpha$  signals through PKC $\zeta$ /NF- $\kappa$ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes*, 59(11):2872-82. <https://doi.org/10.2337/db09-1606>

Babwah, A. V., Navarro, V. M., Ahow, M., Pampillo, M., Nash, C., Fayazi, M., Calder M, Elbert A, Urbanski HF, Wettschureck N, Offermanns S, Carroll RS, Bhattacharya M, Tobet SA, & Kaiser, U. B. (2015). GnRH neuron-specific ablation of G $\alpha$ <sub>q</sub>/11 results in only partial inactivation of the neuroendocrine-reproductive axis in both male and female mice: In vivo evidence for kiss1r-coupled G $\alpha$ <sub>q</sub>/11-independent GnRH secretion. *Journal of Neuroscience*, 35(37), 12903–12916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0041-15.2015>

Ballou, L. M., Lin, H. Y., Fan, G., Jiang, Y. P., & Lin, R. Z. (2003). Activated G $\alpha$ <sub>q</sub> inhibits p110 $\alpha$  phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23472–23479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212232200>

Benincá, C., Planagumà, J., de Freitas Shuck, A., Acín-Perez, R., Muñoz, J. P., de Almeida, M. M., Brown JH, Murphy AN, Zorzano A, Enríquez JA, & Aragay, A. M. (2014). A new non-canonical pathway of G $\alpha$ <sub>q</sub> protein regulating mitochondrial dynamics and bioenergetics. *Cellular Signalling*, 26(5), 1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.009>

Bhattacharya, S., Mahavadi, S., Al-Shboul, O., Rajagopal, S., Grider, J. R., & Murthy, K. S. (2013). Differential regulation of muscarinic M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptor signaling in gastrointestinal smooth muscle by caveolin-1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(3), C334–C347. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2012>

Birukova, A. A., Zagranichnaya, T., Alekseeva, E., Bokoch, G. M., & Birukov, K. G. (2008). Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), 715–724. <https://doi.org/10.1002/jcp.21354>

Boya, P. (2012). Lysosomal function and dysfunction: Mechanism and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(5):766-74. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4405>

Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH



oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208–226. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>

Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.006>

Breen, S. M., Andric, N., Ping, T., Xie, F., Offermans, S., Gossen, J. A., & Ascoli, M. (2013). Ovulation Involves the Luteinizing Hormone-Dependent Activation of Gq/11 in Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology*, 27(9), 1483–1491. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1130>

Breuer, J., Herich, S., Schneider-Hohendorf, T., Chasan, A. I., Wettschureck, N., Gross, C. C., Loser K, Zarbock A, Roth J, Klotz L, Wiendl H, & Schwab, N. (2018). Dual action by fumaric acid esters synergistically reduces adhesion to human endothelium. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(14), 1871–1882. <https://doi.org/10.1177/1352458517735189>

Brojakowska, A., Narula, J., Shimony, R., & Bander, J. (2020). Clinical Implications of SARS-CoV-2 Interaction With Renin Angiotensin System. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(24), 3085–3095. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.04.028>

Burke, R. M., & Berk, B. C. (2015). The Role of PB1 Domain Proteins in Endothelial Cell Dysfunction and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(14), 1243–1256. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6182>

Carman, C. V., Parent, J.-L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman AG, Benovic JL, & Kozasa, T. (1999). Selective Regulation of G $\alpha_{q/11}$  by an RGS Domain in the G Protein-coupled Receptor Kinase, GRK2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34483–34492. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34483>

Cartier, A., Parent, A., Labrecque, P., Laroche, G., & Parent, J. L. (2011). WDR36 acts as a scaffold protein tethering a G-protein-coupled receptor, G $\alpha_q$  and phospholipase C $\beta$  in a signalling complex. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3292–3304. <https://doi.org/10.1242/jcs.085795>

Chan, K., & Kan, Y. W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12731>

Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., & Cheng, J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*, 225, 83–99. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0662>

Chen, H., Xie, K., Han, H., Li, Y., Liu, L., Yang, T., & Yu, Y. (2015). Molecular

hydrogen protects mice against polymicrobial sepsis by ameliorating endothelial dysfunction via an Nrf2/HO-1 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 28(1), 643–654. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2015.07.034>

Chen, Q. M., & Maltagliati, A. J. (2018). Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiological Genomics*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00041.2017>

Chichger, H., Rounds, S., & Harrington, E. O. (2019). Endosomes and Autophagy: Regulators of Pulmonary Endothelial Cell Homeostasis in Health and Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 31(13), 994–1008. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7817>

Chishiki, K., Kamakura, S., Yuzawa, S., Hayase, J., & Sumimoto, H. (2013). Ubiquitination of the heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits G $\alpha$ i2 and G $\alpha$ q is prevented by the guanine nucleotide exchange factor Ric-8A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.103>

Cleator, J. H., Zhu, W. Q., Vaughan, D. E., & Hamm, H. E. (2006). Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*, 107(7), 2736–2744. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2698>

Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology*, 23(11), 1024–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.049>

Cornelissen, I., Palmer, D., David, T., Wilsbacher, L., Concengco, C., Conley, P., Pandey A, & Coughlin, S. R. (2010). Roles and interactions among protease-activated receptors and P2ry12 in hemostasis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18605–18610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013309107>

Costa, L. B., Perez, L. G., Palmeira, V. A., Macedo e Cordeiro, T., Ribeiro, V. T., Lanza, K., & Simões e Silva, A. C. (2020). Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions With the Renin-Angiotensin System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.559841>

Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1800–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01377.x>

Crouthamel, M., Thiagarajan, M. M., Evanko, D. S., & Wedegaertner, P. B. (2008). N-terminal polybasic motifs are required for plasma membrane localization of G $\alpha$ s and G $\alpha$ q. *Cellular Signalling*, 20(10), 1900–1910. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.019>

Dai, G., Vaughn, S., Zhang, Y., Wang, E. T., Garcia-Cardena, G., & Gimbrone, M. A. (2007). Biomechanical Forces in Atherosclerosis-Resistant Vascular Regions Regulate Endothelial Redox Balance via Phosphoinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Activation of Nrf2. *Circulation Research*, 101(7), 723–733. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152942>

Dave, R. H., Saengsawang, W., Yu, J.-Z., Donati, R., & Rasenick, M. M. (2009). Heterotrimeric G-Proteins Interact Directly with Cytoskeletal Components to Modify Microtubule-Dependent Cellular Processes. *Neurosignals*, 17(1), 100–108. <https://doi.org/10.1159/000186693>

De Candia, E. (2012). Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thrombosis Research*, 129(3), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.001>

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2007).  $\beta$ -Arrestins and Cell Signaling. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 483–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749>

Dong, W., He, B., Qian, H., Liu, Q., Wang, D., Li, J., Wei Z, Wang Z, Xu Z, Wu G, Qian G, & Wang, G. (2018). RAB26-dependent autophagy protects adherens junctional integrity in acute lung injury. *Autophagy*, 14. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1476811>

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen M, Moscat J, & Diaz-Meco, M. T. (2011). P62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway. *Molecular Cell*, 44(1), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.038>

Duran, A., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2003). Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by  $\zeta$ PKC in NF- $\kappa$ B transcriptional activation. *EMBO Journal*, 22(15), 3910–3918. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg370>

Durán, A., Serrano, M., Leitges, M., Flores, J. M., Picard, S., Brown, J. P., Moscat J, & Diaz-Meco, M. T. (2004). The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Developmental Cell*, 6(2), 303–309. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00403-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00403-9)

Dutta, D., Calvani, R., Bernabei, R., Leeuwenburgh, C., & Marzetti, E. (2012). Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: Mechanisms and therapeutic opportunities. (D. Sinclair & B. North, Eds.), *Circulation Research*. Lippincott Williams & WilkinsHagerstown, MD. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246108>

Echeverría, V., Hinrichs, M. V., Torrejón, M., Roperio, S., Martinez, J., Toro, M. J., & Olate, J. (2000). Mutagenesis in the switch IV of the helical domain of the human

Gs $\alpha$  reduces its GDP/GTP exchange rate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 76(3), 368–375. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(20000301\)76:3<368::AID-JCB4>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(20000301)76:3<368::AID-JCB4>3.0.CO;2-B)

Fabre, J. E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J. A., Audoly, L. P., Coffman, T. M., & Koller, B. H. (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y<sub>1</sub>-deficient mice. *Nature Medicine*, 5(10), 1199–1202. <https://doi.org/10.1038/13522>

Fang, C., Gu, L., Smerin, D., Mao, S., & Xiong, X. (2017). The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017:8495160. <https://doi.org/10.1155/2017/8495160>

Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>

Fukutomi, T., Takagi, K., Mizushima, T., Ohuchi, N., & Yamamoto, M. (2014). Kinetic, Thermodynamic, and Structural Characterizations of the Association between Nrf2-DLGex Degron and Keap1. *Molecular and Cellular Biology*, 34(5), 832–846. <https://doi.org/10.1128/mcb.01191-13>

Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P. Y., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos GD, & Tall, G. G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein  $\alpha$  subunit membrane association. *Science Signaling*, 4(200): ra79. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002223>

Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>

Galluzzi, L., & Green, D. R. (2019). Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.026>

Galluzzi, L., Yamazaki, T., & Kroemer, G. (2018). Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11), 731–745. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0068-0>

García-Hoz C, Sánchez-Fernández G, Díaz-Meco MT, Moscat J, Mayor F, Ribas

C. (2010). G $\alpha$ q Acts as an Adaptor Protein in Protein Kinase C (PKC $\zeta$ )-mediated ERK5 Activation by G Protein-coupled. *J Biol Chem.* 2010 Apr 30;285(18):13480-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098699>

García-Hoz C, Sánchez-Fernández G, García-Escudero R, Fernández-Velasco M, Palacios-García J, Ruiz-Meana M, Díaz-Meco MT, Leitges M, Moscat J, García-Dorado D, Boscá L, Mayor F Jr, Ribas C. (2012). Protein Kinase C (PKC $\zeta$ )-mediated G $\alpha$ q Stimulation of ERK5 Protein Pathway in Cardiomyocytes and Cardiac Fibroblasts. *J Biol Chem.* 2012 Mar 2;287(10):7792-802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282210>

Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, Raizada MK, Grant MB, Oudit GY. (2020). Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circulation Research*, May 8;126(10):1456-1474. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015>

Gill, S. E., Rohan, M., & Mehta, S. (2015). Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Respiratory Research*, 16(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0266-7>

Gudermann, T., Schöneberg, T., & Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 20(1), 399–427. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.399>

Gumundsdottir, I. J., Lang, N. N., Boon, N. A., Ludlam, C. A., Webb, D. J., Fox, K. A., & Newby, D. E. (2008). Role of the Endothelium in the Vascular Effects of the Thrombin Receptor (Protease-Activated Receptor Type 1) in Humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(18), 1749–1756. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.12.047>

Guo F, Li X, Peng J, Tang Y, Yang Q, Liu L, Wang Z, Jiang Z, Xiao M, Ni C, Chen R, Wei D, Wang GX. (2014). Autophagy regulates vascular endothelial cell eNOS and ET-1 expression induced by laminar shear stress in an ex vivo perfused system. *Annals of Biomedical Engineering*, Sep;42(9):1978-88. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1033-5>

Guo, Z., & Mo, Z. (2020). Keap1-Nrf2 signaling pathway in angiogenesis and vascular diseases. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Jun;14(6):869-883. <https://doi.org/10.1002/term.3053>

Han J, Pan XY, Xu Y, Xiao Y, An Y, Tie L, Pan Y, Li XJ. (2012). Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage. *Autophagy*, May 1;8(5):812-25. <https://doi.org/10.4161/auto.19471>

Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D.

E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>

Hepler, J. R., & Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(10), 383–387. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90005-T](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90005-T)

Hewavitharana, T., & Wedegaertner, P. B. (2012). Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling*, Jan;24(1):25–34. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.08.014>

Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(1), 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>

Hirano Y, Yoshinaga S, Takeya R, Suzuki NN, Horiuchi M, Kohjima M, Sumimoto H, Inagaki F. (2005). Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9653–9661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409823200>

Hubbard, K. B., & Hepler, J. R. (2006). Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cellular Signalling*, 18(2), 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.08.004>

Husted, A. S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S. A., & Schwartz, T. W. (2017). GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metabolism*. 25(4):777–796. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.008>

Ibarrondo, J., Joubert, D., Dufour, M. N., Cohen-Solal, A., Homburger, V., Jard, S., & Guillon, G. (1995). Close association of the  $\alpha$  subunits of G(q) and G11 G proteins with actin filaments in WRK1 cells: Relation to G protein-mediated phospholipase C activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8413–8417. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8413>

Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, & Komatsu M. (2013). Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 51(5), 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>

Ikeda, S., Yamaoka-Tojo, M., Hilenski, L., Patrushev, N. A., Anwar, G. M., Quinn, M. T., & Ushio-Fukai, M. (2005). IQGAP1 Regulates Reactive Oxygen Species-Dependent Endothelial Cell Migration Through Interacting With Nox2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(11), 2295–2300. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000187472.55437.af>

Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.-M., Xiao, J.-H., Chambon, P., &



Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER T and Cre-ER T2 recombinases. *Nucleic Acids Research* (Vol. 27).

Itakura, E., & Mizushima, N. (2011). p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009067>

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, & Nabeshima Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., & Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22576–22591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>

Jain, A., Rusten, T. E., Katheder, N., Elvenes, J., Bruun, J. A., Sjøttem, E., & Johansen, T. (2015). P62/sequestosome-1, autophagy-related gene 8, and autophagy in *Drosophila* are regulated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2(NRF2), independent of transcription factor TFEB. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14945–14962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656116>

Jewell, J. L., & Guan, K. L. (2013). Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.004>

Johnson, E. R., & Matthay, M. A. (2010). Acute lung injury: Epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1089/jamp.2009.0775>

Johnson, G. J., Leis, L. A., & Dunlop, P. C. (1996). Specificity of Gαq and Gα11 gene expression in platelets and erythrocytes. Expressions of cellular differentiation and species differences. *Biochemical Journal*, 318(3), 1023–1031. <https://doi.org/10.1042/bj3181023>

Juhasz, G., & Neufeld, T. P. (2006). Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. *PLoS Biology*, 4(2), e36. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040036>

Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal*, 282(24):4672-8. <https://doi.org/10.1111/febs.13540>

Kim, G. Y., Nigro, P., Fujiwara, K., Abe, J. I., & Berk, B. C. (2012). P62 binding to protein kinase C  $\zeta$  regulates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptotic pathway in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 2974–2980. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300054>

Kim, J., & Guan, K. L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nature Cell Biology*, 21(1):63–71. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0205-1>

Kim, J. H., Song, H. B., Jun, H. O., Kim, J. H., Yu, Y. S., & Kim, K. W. (2014). Suppression of protein kinase C- $\zeta$  attenuates vascular leakage via prevention of tight junction protein decrease in diabetic retinopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.002>

Kim, M., Kim, S., Lim, J. H., Lee, C., Choi, H. C., & Woo, C.-H. (2012). Laminar flow activation of ERK5 protein in vascular endothelium leads to atheroprotective effect via NF-E2-related factor 2 (Nrf2) activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40722–40731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381509>

Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology*, 12(3), 213–223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>

Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schütz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. (2009). Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(2), 411–420. <https://doi.org/10.1084/jem.20082150>

Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell*, 40(2):280–93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023>

Krupnick, J. G., & Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 289–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.289>

Ktistakis, N. T., & Tooze, S. A. (2016). Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends in Cell Biology*. 26(8):624–635. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.006>

Larocca, T. J., Henson, G. D., Thorburn, A., Sindler, A. L., Pierce, G. L., & Seals, D. R. (2012). Translational evidence that impaired autophagy contributes to arterial ageing. *Journal of Physiology*, 590(14):3305–16. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.229690>



Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., & Zhang, D. D. (2010). A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*, 30(13), 3275–3285. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>

Li H, He B, Liu X, Li J, Liu Q, Dong W, Xu Z, Qian G, Zuo H, Hu C, Qian H, Mao C, Wang G. (2017). Regulation on toll-like receptor 4 and cell barrier function by Rab26 siRNA-loaded DNA nanovector in pulmonary microvascular endothelial cells. *Theranostics*, 7(9):2537-2554. <https://doi.org/10.7150/thno.17584>

Li, J., Han, X., Knauss, E. A., Woulfe, D. S., & Nieman, M. T. (2020). *GPCRs in thromboinflammation and hemostasis*. GPCRs. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816228-6.00019-2>

Li, L., & Zhang, X. (2013). Differential inhibition of the TRPM8 ion channel by Gαq and Gα11. *Channels*, 7(April), 115–118. <https://doi.org/10.4161/chan.23466>

Linder, M. E., Middleton, P., Hepler, J. R., Taussig, R., Gilman, A. G., & Mumby, S. M. (1993). Lipid modifications of G proteins: α Subunits are palmitoylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3675–3679. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3675>

Litosch, I. (2016). Decoding Gαq signaling. *Life Sciences*. 152:99-106. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.037>

Little, K. D., Hemler, M. E., & Stipp, C. S. (2004). Dynamic Regulation of a GPCR-Tetraspanin-G Protein Complex on Intact Cells: Central Role of CD81 in Facilitating GPR56-Gαq/11 Association. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2375–2387. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0886>

Liu, Y. (2012). Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. *World Journal of Experimental Medicine*, 2(2), 30. <https://doi.org/10.5493/wjem.v2.i2.30>

Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016, September 1). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>

Lucas E, Jurado-Pueyo M, Fortuño MA, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Jiménez-Borreguero LJ, Lazcano JJ, Gao E, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Koch WJ, Díez J, Mayor F Jr, & Murga C. (2014). Downregulation of G protein-coupled receptor kinase 2 levels enhances cardiac insulin sensitivity and switches on cardioprotective gene expression patterns. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(12 Pt A):2448-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.004>

Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., & Wieland, T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11134–11139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411322200>

Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T, & Tesmer JJ. (2007). Structure of Gαq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science*, 318(5858):1923-7 <https://doi.org/10.1126/science.1147554>

Ma X, Liu X, Feng J, Zhang D, Huang L, Li D, Yin L, Li L, & Wang XZ. (2019). Fraxin Alleviates LPS-Induced ARDS by Downregulating Inflammatory Responses and Oxidative Damages and Reducing Pulmonary Vascular Permeability. *Inflammation*, 42(5), 1901–1912. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01052-8>

Ma, Y. C., & Huang, X. Y. (1998). Identification of the binding site for Gqα on its effector Bruton's tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12197–12201. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12197>

Magalhaes, A. C., Dunn, H., & Ferguson, S. S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1717–1736. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x>

Mashima H, Watanabe N, Sekine M, Matsumoto S, Asano T, Yuhashi K, Sagihara N, Urayoshi S, Uehara T, Fujiwara J, Ishii T, Tsuboi R, Miyatani H, & Ohnishi H. (2018). The role of Gαq/Gα11 signaling in intestinal epithelial cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.01.003>

Mayor, F., Cruces-Sande, M., Arcones, A. C., Vila-Bedmar, R., Briones, A. M., Salaices, M., & Murga, C. (2018). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as an integrative signalling node in the regulation of cardiovascular function and metabolic homeostasis. *Cellular Signalling*, 41:25-32. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.002>

Medina, R., Grishina, G., Meloni, E. G., Muth, T. R., & Berlot, C. H. (1996). Localization of the effector-specifying regions of G(i2α) and G(qα). *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24720–24727. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24720>

Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling : physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292(1):C82-97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006>

Mejia, R., Waite, C., & Ascoli, M. (2015). Activation of Gq/11 in the Mouse Corpus Luteum Is Required for Parturition. *Molecular Endocrinology*, 29(2), 238–246.

<https://doi.org/10.1210/me.2014-1324>

Mikelis CM, Simaan M, Ando K, Fukuhara S, Sakurai A, Amornphimoltham P, Masedunskas A, Weigert R, Chavakis T, Adams RH, Offermanns S, Mochizuki N, Zheng Y, & Gutkind JS. (2015). RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nature Communications*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms7725>

Milligan, G., & Kostenis, E. (2009). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S46–S55. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>

Minshall, R. D., Vandenbroucke, E. E., Holinstat, M., Place, A. T., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., & Malik, A. B. (2010). Role of protein kinase C $\zeta$  in thrombin-induced RhoA activation and inter-endothelial gap formation of human dermal microvessel endothelial cell monolayers. *Microvascular Research*, 80(2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/J.MVR.2010.04.007>

Moscat, J, Diaz-Meco, M. T., & Wooten, M. W. (2009). Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1426–1437. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.119>

Moscat, Jorge, Diaz-Meco, M. T., Albert, A., & Campuzano, S. (2006). Cell Signaling and Function Organized by PB1 Domain Interactions. *Molecular Cell*, 23(5), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.002>

Moscat, Jorge, Karin, M., & Diaz-Meco, M. T. (2016). p62 in Cancer: Signaling Adaptor Beyond Autophagy. *Cell*, 167(3), 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.030>

Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003>

Murga, C., Arcones, A. C., Cruces-Sande, M., Briones, A. M., Salaices, M., & Mayor, F. (2019). G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a potential therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 10:112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00112>

Nezis, I. P., & Stenmark, H. (2012). P62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling, and cancer. *Antioxidants and Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4394>

Nigro P, Abe J, Woo CH, Satoh K, McClain C, O'Dell MR, Lee H, Lim JH, Li JD, Heo KS, Fujiwara K, & Berk BC. (2010). PKC $\zeta$  decreases eNOS protein stability

via inhibitory phosphorylation of ERK5. *Blood*, 116(11), 1971–1979. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-269134>

Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., & Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes to Cells*, 11(5), 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00959.x>

Nogués L, Palacios-García J, Reglero C, Rivas V, Neves M, Ribas C, Penela P, Mayor F Jr. (2018). G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in tumorigenesis and cancer progression: GPCR regulators and signaling hubs. *Seminars in Cancer Biology*. 48:78-90. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.013>

Nogués L, Palacios-García J, Reglero C, Rivas V, Neves M, Ribas C, Penela P, & Mayor F Jr. (2017). G-protein-coupled receptor kinase 2 as a potential modulator of the hallmarks of cancer. *Molecular Pharmacology*, 48:78-90. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107185>

Offermanns, S, & Simon, M. I. (1998). Genetic analysis of mammalian G-protein signalling. *Oncogene*, 17(11 Reviews), 1375–1381. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202173>

Offermanns, Stefan. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, 99(12):1293-304. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000251742.71301.16>

Offermanns, Stefan, Toombs, C. F., Hu, Y. H., & Simon, M. I. (1997). Defective platelet activation in Gα(q)-deficient mice. *Nature*, 389(6647), 183–186. <https://doi.org/10.1038/38284>

Offermanns, Stefan, Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I., & Wilkie, T. M. (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in Gα(q)/Gα11-mutant mice. *EMBO Journal*, 17(15), 4304–4312. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4304>

Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1):60-71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>

Ornatowski, W., Lu, Q., Yegambaram, M., Garcia, A. E., Zemskov, E. A., Maltepe, E., & Black, S. M. (2020). Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biology*, 36(August), 101679. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101679>

Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Koh GY, Franco D, Kurtcuoglu V, Poulikakos D, Baluk P, McDonald

D, Grazia Lampugnani M, & Dejana E. (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature Communications*, 3(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms2199>

Orth, J. H. C., Lang, S., & Aktories, K. (2004). Action of *Pasteurella multocida* toxin depends on the helical domain of Gαq. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34150–34155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405353200>

Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade-Gordon P, Frank RD, & Mackman N. (2004). Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*, 103(4):1342-7. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3051>

Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(9), 639–650. <https://doi.org/10.1038/nrm908>

Posma, J. J., Grover, S. P., Hisada, Y., Owens, A. P., Antoniak, S., Spronk, H. M., & Mackman, N. (2019). Roles of Coagulation Proteases and PARs (Protease-Activated Receptors) in Mouse Models of Inflammatory Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(1):13-24. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311655>

Qiu, Y., Wang, Y., Law, P. Y., Chen, H. Z., & Loh, H. H. (2011). Cholesterol regulates μ-opioid receptor-induced β-arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. *Molecular Pharmacology*, 80(1), 210–218. <https://doi.org/10.1124/mol.110.070870>

Racanelli, A. C., Kikkers, S. A., Choi, A. M. K., & Cloonan, S. M. (2018). Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy*, 14(2):221-232. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1389823>

Radu, M., & Chernoff, J. (2013). An in vivo assay to test blood vessel permeability. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (73), e50062. <https://doi.org/10.3791/50062>

Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skinotitis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. (2011). Crystal structure of the b 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366):549-55. <https://doi.org/10.1038/nature10361>

Ren, J., Wang, J., Wang, Z. X., & Wu, J. W. (2014). Structural and biochemical insights into the homotypic PB1-PB1 complex between PKCζ and p62. *Science China Life Sciences*, 57(1), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4592-z>

Rhee, S. G. (2001). Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 281–312. <https://doi.org/10.1146/annurev>

biochem.70.1.281

Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J, Gomez-Guerrero C. (2018). Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front. Pharmacol.*, 9:819. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00819>

Rochdi, M. D., & Parent, J. L. (2003). G $\alpha$ q-coupled receptor internalization specifically induced by G $\alpha$ q signaling. Regulation by EBP50. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17827–17837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210319200>

Rusu L, Andreeva A, Visintine DJ, Kim K, Vogel SM, Stojanovic-Terpo A, Chernaya O, Liu G, Bakhshi FR, Haberichter SL, Iwanari H, Kusano-Arai O, Suzuki N, Hamakubo T, Kozasa T, Cho J, Du X, & Minshall RD. (2014). G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion. *Blood*, 123(3), 442–450. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489351>

Sánchez-Fernández G, Cabezudo S, Caballero Á, García-Hoz C, Tall GG, Klett J, Michnick SW, Mayor F Jr, Ribas C. (2016). Protein Kinase C  $\zeta$  Interacts with a Novel Binding Region of G $\alpha$ q to Act as a Functional Effector. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(18), 9513–9525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684308>

Sánchez-Fernández, G., Cabezudo, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Aragay, A. M., Mayor, F., & Ribas, C. (2014). G $\alpha$ q signalling: The new and the old. *Cellular Signalling*, 26, 833–848. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.010>

Sánchez-Martín, P., & Komatsu, M. (2018). p62/SQSTM1 - steering the cell through health and disease. *Journal of Cell Science*, 131(21), jcs222836. <https://doi.org/10.1242/jcs.222836>

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>

Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & van der Poll, T. (2008). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3), 536–545. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607373>

Sengupta, P., Philip, F., & Scarlata, S. (2008). Caveolin-1 alters Ca<sup>2+</sup> signal duration through specific interaction with the G $\alpha$ q family of G proteins. *Journal of Cell Science*, 121(9), 1363–1372. <https://doi.org/10.1242/jcs.020081>

Shankaranarayanan, A., Thal, D. M., Tesmer, V. M., Roman, D. L., Neubig, R. R., Kozasa, T., & Tesmer, J. J. G. (2008). Assembly of high order G $\alpha$ q-effector complexes with RGS proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(50), 34923–34934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805860200>



Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242). <https://doi.org/10.1038/nature07976>

Sivaraj KK, Li R, Albarran-Juarez J, Wang S, Tischner D, Grimm M, Swiercz JM, Offermanns S, & Wettschureck N. (2015). Endothelial Gαq/11 is required for VEGF-induced vascular permeability and angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 108(1), 171–180. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv216>

Sorkin, A., & Von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>

Sprang, S. R., Chen, Z., & Du, X. (2007). Structural Basis of Effector Regulation and Signal Termination in Heterotrimeric Gα Proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 74:1-65. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(07\)74001-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(07)74001-9)

Standfuss, J., Edwards, P. C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D. D., & Schertler, G. F. X. (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 471(7340), 656–660. <https://doi.org/10.1038/nature09795>

Sterne-Marr R, Tesmer JJ, Day PW, Stracquatano RP, Cilente JA, O'Connor KE, Pronin AN, Benovic JL, & Wedegaertner PB. (2003). G protein-coupled receptor kinase 2/Gαq/11 interaction: A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding Gα subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6050–6058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208787200>

Sugawara, Y., Nishii, H., Takahashi, T., Yamauchi, J., Mizuno, N., Tago, K., & Itoh, H. (2007). The lipid raft proteins flotillins/reggies interact with Gαq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase. *Cellular Signalling*, 19(6), 1301–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.01.012>

Sumimoto, H., Kamakura, S., & Ito, T. (2007). Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(401), re6. <https://doi.org/10.1126/stke.4012007re6>

Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19):3850-68. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>

Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, & Yamamoto M. (2012). Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

*America*, 109(34), 13561–13566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121572109>

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>

Tall, G. G., Krumins, A. M., & Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8356–8362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211862200>

Tasset, I., & Cuervo, A. M. (2016). Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS Journal*, 283(13):2403-13. <https://doi.org/10.1111/febs.13677>

Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 13;293(15):5414-5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237>

Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., & Tesmer, J. J. G. (2005). Structural biology: Snapshot of activated G proteins at the membrane: The G $\alpha$ q-GRK2-G $\beta$  $\gamma$  complex. *Science*, 310(5754), 1686–1690. <https://doi.org/10.1126/science.1118890>

Touyz, R. M., & Berry, C. (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, 35(9), 1001–1015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219172>

Vaqué, J. P., Dorsam, R. T., Feng, X., Iglesias-Bartolome, R., Forsthoefel, D. J., Chen, Q., & Gutkind, J. S. (2013). A Genome-wide RNAi Screen Reveals a Trio-Regulated Rho GTPase Circuitry Transducing Mitogenic Signals Initiated by G Protein-Coupled Receptors. *Molecular Cell*, 49(1), 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.018>

Vion AC, Kheloufi M, Hammoutene A, Poisson J, Lasselin J, Devue C, Pic I, Dupont N, Busse J, Stark K, Lafaurie-Janvire J, Barakat AI, Loyer X, Souyri M, Viollet B, Julia P, Tedgui A, Codogno P, Boulanger CM, & Rautou PE. (2017). Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(41):E8675-E8684. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702223114>

Waldo, G. L., Ricks, T. K., Hicks, S. N., Cheever, M. L., Kawano, T., Tsuboi, K., & Kendall Harden, T. (2010). Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C- $\beta$  and Gq signaling complex. *Science*, 330(6006), 974–980. <https://doi.org/10.1126/science.1193438>

Wang C, Luo Z, Carter G, Wellstein A, Jose PA, Tomlinson J, Leiper J, Welch



WJ, Wilcox CS, & Wang D. (2017). NRF2 prevents hypertension, increased ADMA, microvascular oxidative stress, and dysfunction in mice with two weeks of ANG II infusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 314(3):R399-R406. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00122.2017>

Wang H, Wei W, Lan X, Liu N, Li Y, Ma H, Sun T, Peng X, Zhuang C, & Yu J. (2019). Neuroprotective Effect of Swertiamain on Cerebral Ischemia/ Reperfusion Injury by Inducing the Nrf2 Protective Pathway. *ACS Chem Neurosci.*, 10(5):2276-2286. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00605>

Wang, J., Niu, N., Xu, S., & Jin, Z. G. (2019). A simple protocol for isolating mouse lung endothelial cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1458. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37130-4>

Wang, L., Chen, J., Wang, B., Wu, D., Li, H., Lu, H., & Chai, Y. (2014). Protective effect of quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting inflammatory cell influx. *Experimental Biology and Medicine*, 239(12), 1653–1662. <https://doi.org/10.1177/1535370214537743>

Watanabe, N., Mashima, H., Miura, K., Goto, T., Yoshida, M., Goto, A., & Ohnishi, H. (2016). Requirement of Gαq/Gα11 Signaling in the Preservation of Mouse Intestinal Epithelial Homeostasis. *CMGH*, 2(6), 767-782.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.08.001>

Wei J, Chen G, Shi X, Zhou H, Liu M, Chen Y, Feng D, Zhang P, Wu L, & Lv X. (2018). Nrf2 activation protects against intratracheal LPS induced mouse/murine acute respiratory distress syndrome by regulating macrophage polarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(3), 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.161>

Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85(4):1159-204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>

Wettschureck, N., Strilic, B., & Offermanns, S. (2019). Passing the vascular barrier: Endothelial signaling processes controlling extravasation. *Physiological Reviews*, 99(3), 1467–1525. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2018>

Williams SL, Lutz S, Charlie NK, Vettel C, Ailion M, Coco C, Tesmer JJ, Jorgensen EM, Wieland T, & Miller KG. (2007). Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Gαq effector in *C. elegans*. *Genes and Development*, 21(21), 2731–2746. <https://doi.org/10.1101/gad.1592007>

Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., & Williams, R. L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular Cell*, 12(1), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.06.011>

doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00246-6

Wise, A., Carr, I. C., Groarke, D. A., & Milligan, G. (1997). Measurement of agonist efficacy using an  $\alpha(2A)$ -adrenoceptor-G(i1) $\alpha$  fusion protein. *FEBS Letters*, 419(1), 141–146. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01431-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01431-2)

Xu X, Zeng W, Popov S, Berman DM, Davignon I, Yu K, Yowe D, Offermanns S, Muallem S, & Wilkie TM. (1999). RGS proteins determine signaling specificity of G(q)-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3549–3556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3549>

Yamazaki, T., & Yazaki, Y. (2000). Molecular basis of cardiac hypertrophy, 89(1):1-6. <https://doi.org/10.1007/s003920050001>

Yang, J., Boerm, M., McCarty, M., Bucana, C., Fidler, I. J., Zhuang, Y., & Su, B. (2000). Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nature Genetics*, 24(3), 309–313. <https://doi.org/10.1038/73550>

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 12(9):814-22. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>

Zhang, D., Zhou, J., Ye, L. C., Li, J., Wu, Z., Li, Y., & Li, C. (2018). Autophagy maintains the integrity of endothelial barrier in LPS-induced lung injury. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 688–698. <https://doi.org/10.1002/jcp.25928>

Zhang T, Li Z, Dang H, Chen R, Liaw C, Tran TA, Boatman PD, Connolly DT, & Adams JW. (2012). Inhibition of Mas G-protein signaling improves coronary blood flow, reduces myocardial infarct size, and provides long-term cardioprotection. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 302(1), H299–H311. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2011>

Zhang, Y., Jiang, G., Sauler, M., & Lee, P. J. (2013). Lung endothelial HO-1 targeting *in vivo* using lentiviral miRNA regulates apoptosis and autophagy during oxidant injury. *The FASEB Journal*, 27(10), 4041–4058. <https://doi.org/10.1096/fj.13-231225>

#### CRÉDITOS DE IMAGEN:

Para la generación de las figuras que aparecen en esta tesis se utilizaron imágenes originales de <https://smart.servier.com/> bajo licencia Creative Commons.

## *APÉNDICE*

ORIGINAL ARTICLE



# Compensatory increase of VE-cadherin expression through ETS1 regulates endothelial barrier function in response to TNFα

Natalia Colás-Algora<sup>1</sup> · Diego García-Weber<sup>1,5</sup> · Cristina Cacho-Navas<sup>1</sup> · Susana Barroso<sup>1</sup> · Alvaro Caballero<sup>1,2,3</sup> · Catalina Ribas<sup>1,2,3,4</sup> · Isabel Correias<sup>1,2</sup> · Jaime Millán<sup>1</sup>

Received: 28 January 2019 / Revised: 24 July 2019 / Accepted: 29 July 2019  
© Springer Nature Switzerland AG 2019

## Abstract

VE-cadherin plays a central role in controlling endothelial barrier function, which is transiently disrupted by proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNFα). Here we show that human endothelial cells compensate VE-cadherin degradation in response to TNFα by inducing VE-cadherin de novo synthesis. This compensation increases adherens junction turnover but maintains surface VE-cadherin levels constant. NF-κB inhibition strongly reduced VE-cadherin expression and provoked endothelial barrier collapse. Bacterial lipopolysaccharide and TNFα upregulated the transcription factor ETS1, in vivo and in vitro, in an NF-κB dependent manner. *ETS1* gene silencing specifically reduced VE-cadherin protein expression in response to TNFα and exacerbated TNFα-induced barrier disruption. We propose that TNFα induces not only the expression of genes involved in increasing permeability to small molecules and immune cells, but also a homeostatic transcriptional program in which NF-κB- and ETS1-regulated VE-cadherin expression prevents the irreversible damage of endothelial barriers.

**Keywords** Endothelial barrier function · Permeability · VE-cadherin · NF-κB · ETS1 · LPS · Resolution of inflammation · Adherens junctions · Degradation

## Introduction

A major effect of long-term inflammatory stimulation is the progressive and transient disruption of endothelial barrier integrity, which underlies the development of many proinflammatory diseases. Inflammatory cytokines such as TNFα, interferon (IFN)-γ and interleukin (IL)-1β induce actin-dependent morphological remodeling and a transcriptional program to express proteins that increase vascular leakiness to immune cells and small molecules through mechanisms that are not fully understood [1, 2].

Vascular endothelial (VE)-cadherin-dependent adherens junctions (AJs) are the main regulators of endothelial barrier properties in many vascular beds [3, 4]. VE-cadherin is the transmembrane partner of cytoplasmic catenins, which stabilize the junctional complex at the cell border and connect AJs to the underlying actin cytoskeleton. Surface VE-cadherin not only regulates permeability, but also promotes cell survival, controls gene transcription, cytoskeleton remodeling and collective endothelial cell migration [3, 5–7]. This wide range of functions suggests that the expression and localization of VE-cadherin must be finely tuned even in the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03260-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Natalia Colás-Algora and Diego García-Weber contributed equally to this work.

✉ Diego García-Weber  
diego.garcia@inserm.fr

✉ Jaime Millán  
jmillan@cbm.csic.es

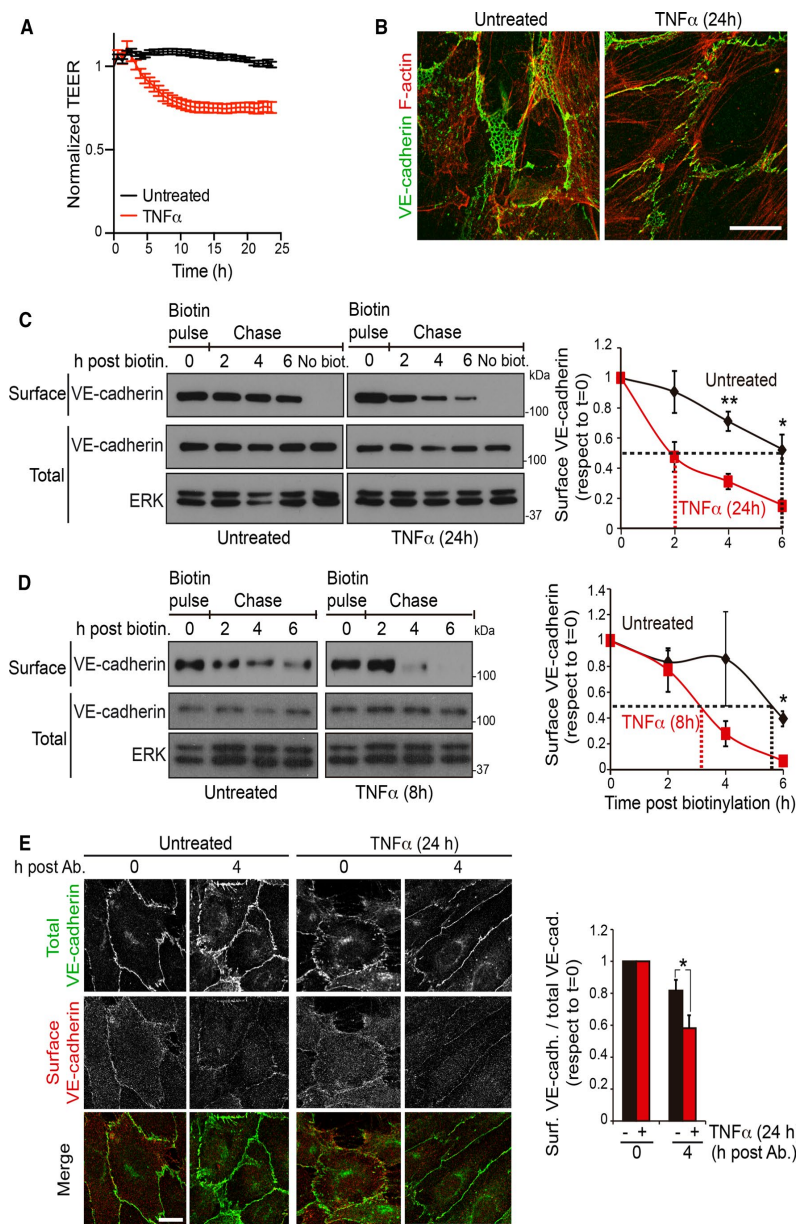
<sup>1</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, 28006 Madrid, Spain

<sup>4</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, ISCIII (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain

<sup>5</sup> Present Address: INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France



context in which barrier function is transiently compromised during the inflammatory response. Inflammatory cytokines and other inflammatory mediators activate the *src* family-dependent tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic tail

of VE-cadherin, which uncouples p120-catenin from VE-cadherin, causing the disruption of AJs and the subsequent internalization of VE-cadherin [2, 8, 9]. However, the effects of cytokine stimulation on VE-cadherin expression and

**Fig. 1** TNF $\alpha$  induces endothelial barrier remodeling and decreases surface VE-cadherin half-life. **a** HUVECs were plated at confluence for 48 h in ECIS arrays pre-coated with fibronectin, then starved for 12 h, stimulated or not with 10 ng/ml TNF $\alpha$  and TEER measured by ECIS. **b** HUVECs were cultured at confluence for 48 h on coverslips pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated or not with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 h. Cells were fixed and stained to analyze the distribution of VE-cadherin and F-actin. Scale bar, 20  $\mu$ m. **c, d** Pulse and chase experiment of surface VE-cadherin. HUVECs were cultured at confluence for at least 48 h on dishes pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated or not with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 h (**c**) or for 8 h (**d**). Surface proteins were labeled with sulfo-NHS-biotin (biotin pulse), cells were incubated at 37 °C for the indicated times and lysed (chase). Surface-biotinylated proteins were isolated by pull-down assay with NeutrAvidin-agarose. Surface VE-cadherin levels were detected with a specific antibody from the pull-down fraction and compared with total VE-cadherin levels from the lysate. Immunoblots of ERK are shown as loading controls. Graphs show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Discontinuous lines mark surface VE-cadherin half-life for each condition. The *t* test analyzed differences between surface VE-cadherin levels in unstimulated and TNF $\alpha$ -stimulated cells at the indicated times \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01. **e** HUVECs were cultured at confluence for at least 48 h on coverslips pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated or not with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 h. Cells were then incubated in the cold with mouse anti-VE-cadherin labeling antibody (surface), as described [16]. HUVECs were then incubated at 37 °C for the indicated times, fixed, permeabilized and stained with a rabbit anti-VE-cadherin antibody (total). Scale bar, 20  $\mu$ m. The right-hand graph shows the ratio between the staining intensities of total and surface-labeled VE-cadherin antibody. Graph shows the mean  $\pm$  SEM from four independent experiments. \**p* < 0.05. See also Fig. S1

stability have not yet been clarified. It has been shown that at least TNF $\alpha$  and the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) can induce VE-cadherin shedding or intracellular degradation, although this induction does not necessarily reduce cellular VE-cadherin levels [10]. Increased VE-cadherin degradation has been observed by simultaneous stimulation of vascular endothelial cells with more than two inflammatory cytokines or by a combination of certain cytokines and immune cells [11]. In contrast, several reports indicate that single cytokine stimulation causes barrier dysfunction in many endothelial beds without significantly decreasing VE-cadherin expression levels [8, 9, 12, 13].

Taking TNF $\alpha$  as a paradigm of inflammatory stimulus that progressively disrupts cellular barriers, and combining biochemical surface labeling and high-resolution microscopy, we have comprehensively analyzed the effect of this cytokine on surface VE-cadherin expression and dynamics in primary human endothelial cells. We show that long-term stimulation with TNF $\alpha$  increases endothelial permeability and reduces surface VE-cadherin half-life but not total VE-cadherin levels. TNF $\alpha$  induces the compensatory expression of a VE-cadherin intracellular pool through NF- $\kappa$ B-dependent regulation of the transcription factor ETS1, which compensates VE-cadherin degradation. Indeed, inhibiting NF- $\kappa$ B abrogates VE-cadherin and ETS1 expression and

causes the collapse of the endothelial barrier, whereas *ETS1* gene silencing specifically regulates VE-cadherin expression, but not other TNF $\alpha$ -regulated genes, and exacerbates TNF $\alpha$ -mediated barrier dysfunction. Thus, our results suggest that endothelial cells implement a transcriptional program, which involves de novo expression of ETS1 and VE-cadherin, to preserve barrier integrity in response to inflammatory cytokines.

## Results

### De novo VE-cadherin expression compensates for reduction of surface VE-cadherin protein half-life in response to TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  induces a progressive increase of permeability in many cellular barriers [2]. In human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), long-term exposure to TNF $\alpha$  reduces TEER from 25 to 40% of initial values (Fig. 1a) [1], remodels the endothelial cytoskeleton (Fig. 1b), alters the crosstalk between VE-cadherin and other cell-cell junction proteins and reduces cell density (Fig. S1A) [1, 13, 14]. This causes VE-cadherin reorganization, decreasing reticular AJs and increasing discontinuous AJs, orthogonal to cell borders and aligned with stress fibers (Fig. 1b) [1, 13]. We set out to quantify the effect of TNF $\alpha$  on surface VE-cadherin half-life by performing pulse and chase experiments of endogenous surface VE-cadherin labeled with sulfo-NHS-biotin. HUVECs were stimulated or not with TNF $\alpha$  for 24 h and their surface proteins were biotinylated for 30 min (Fig. 1c, biotin pulse, time 0 post-biotinylation). Biotin-labeled cells were then incubated at 37 °C and lysed at different times (Fig. 1c, chase). Biotinylated surface proteins were isolated by pull-down assay with NeutrAvidin agarose [15] and endogenous VE-cadherin protein levels in the lysates (Fig. 1c, total) were compared with those in the pull-down fraction (Fig. 1c, surface). As a control, VE-cadherin was not detected in the pull-down fraction from non-biotinylated cells (Fig. 1c). Biotinylated VE-cadherin levels in HUVECs treated with TNF $\alpha$  for 24 h (Fig. 1c) and 8 h (Fig. 1d) decreased faster than in unstimulated HUVECs. From these experiments, we calculated that surface VE-cadherin protein half-life decreased from approximately 6 h in unstimulated cells to 2 h and 3 h in cells previously stimulated with TNF $\alpha$  for 24 h and 8 h, respectively. Treatment with lactacystin or MG132 indicated that proteasome is involved in accelerated biotinylated-VE-cadherin protein decrease in response to TNF $\alpha$  (Fig. S1B). As a complementary approach, we labeled junctional VE-cadherin with a specific antibody that does not alter AJ dynamics [16]. Confocal microscopy analysis showed that VE-cadherin labeling decreased faster in cells pretreated with TNF $\alpha$  for 24 h than in untreated cells

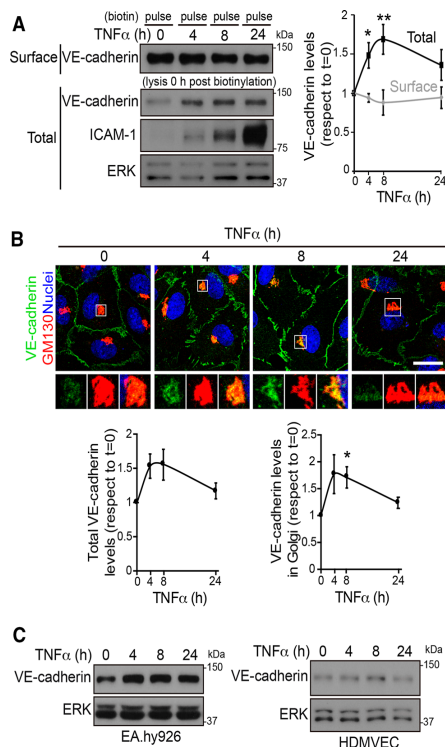


(Fig. 1e). Together, pulse and chase and antibody-mediated labeling experiments indicate that TNF $\alpha$  decreases the half-life of surface VE-cadherin located at junctional domains. Dose–response assays showed that TNF $\alpha$  caused a 15% decrease in cell density at 10 ng/ml TNF $\alpha$ , the cytokine concentration used for the pulse-chase experiments (Fig. S1A). This decrease may contribute to surface VE-cadherin instability, but had no effect on PECAM-1 surface levels and stability, suggesting that this concentration of TNF $\alpha$  does not induce a general effect on the half-life of junctional protein complexes (Fig. S1C).

Although surface VE-cadherin stability, analyzed by pulse and chase experiments, decreased in cells exposed to TNF $\alpha$ , total surface VE-cadherin levels, detected immediately after the pulse with sulfo-NHS-biotin, remained unaltered over the time course of TNF $\alpha$  stimulation (pulse in Fig. 1c, d, time 0 post-biotinylation, and Fig. 2a). Moreover, when lysates were analyzed, a transient increase in total VE-cadherin was detected between 4 and 24 h after TNF $\alpha$  stimulation (Fig. 2a), suggesting that endothelial cells activate mechanisms to express intracellular VE-cadherin molecules that compensate for surface VE-cadherin degradation, yielding constant surface VE-cadherin levels. Confocal analysis of the VE-cadherin distribution revealed a transient accumulation of this protein in an intracellular compartment upon TNF $\alpha$  exposure (Fig. 2b). This intracellular pool colocalized with GM130, a Golgi marker (Fig. 2b, enlarged area), which is compatible with accumulation in the Golgi apparatus of newly synthesized VE-cadherin in response to TNF $\alpha$ . The increase in VE-cadherin was also observed in the HUVEC-derived cell line, EA.hy926 and, to a lesser extent, in human dermal microvascular endothelial cells (HDMVECs) stimulated with TNF $\alpha$  (Fig. 2c). In contrast, other components of AJs, such as catenins, and other vascular cadherins, such as N-cadherin [4, 17], did not change expression in response to TNF $\alpha$  (Fig. S2).

### Intracellular VE-cadherin partially compensates for surface VE-cadherin decrease during acute barrier disruption

In an inflammatory context, endothelial beds are subjected to acute disruption of their integrity by mechanical, thrombotic, and inflammatory factors [2, 14]. We wondered whether endothelial cells maintain VE-cadherin protein levels during acute barrier rupture. TNF $\alpha$ -pretreated primary HUVEC and EA.hy926 cell monolayers were subjected to Ca<sup>2+</sup> switch assay, which provides a stimulus-independent mean of synchronizing the disruption, trafficking and reformation of AJs [18–20]. In brief, cells were cultured in the absence of Ca<sup>2+</sup> for 20 min to disrupt cell–cell junctions, and then switched to normal medium to replenish normal Ca<sup>2+</sup> levels and reform contacts between cells (Fig. 3a). TEER analysis



**Fig. 2** TNF $\alpha$  increases VE-cadherin protein expression but not surface VE-cadherin levels. **a** HUVECs were cultured at confluence for 48 h on dishes pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for the indicated times. Surface proteins were labeled with sulfo-NHS-biotin, and cells were immediately lysed. Surface-biotinylated proteins were isolated by pull-down assay with NeutrAvidin-agarose. Surface VE-cadherin levels were detected with specific antibodies from the pull-down fraction and compared with the expression levels from the lysates (total). ICAM-1 was immunodetected as a control for TNF $\alpha$  stimulation. ERK was immunoblotted as a loading control. The right-hand graph shows the quantification of the changes in total and surface VE-cadherin expression with respect to values in unstimulated cells. Graphs show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. The *t* test compared differences between protein levels at the indicated timepoints of TNF $\alpha$  stimulation with those in unstimulated cells. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01. **b** HUVECs were cultured as in **(a)** and stimulated with TNF $\alpha$  for the indicated times. Cells were fixed, permeabilized and stained with rabbit anti-VE-cadherin against the cytoplasmic VE-cadherin domain, mouse anti-GM130 antibody and DAPI to label nuclei. Scale bar, 20  $\mu$ m. Bottom graphs show the quantification of changes in response to TNF $\alpha$  of total VE-cadherin staining intensity (left) and VE-cadherin staining intensity in the area positive for the Golgi marker GM130 (right). **c** Changes in VE-cadherin expression in response to TNF $\alpha$  stimulation in the HUVEC derived cell line EA.hy926 and in HDMVEC. ERK was immunoblotted as a loading control

revealed a transient rupture of the endothelial barrier and its rapid recovery upon  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment (Fig. 3b). This TEER decrease was not caused by mechanical stress induced by sequential buffer and medium replacements in the well containing the electrodes since buffer solution containing  $\text{Ca}^{2+}$  did not induce significant changes in endothelial barrier properties (Fig. 3b). TEER results obtained with ECIS can be mathematically modelled and separated into specific values, which reflect the contribution of various physiological parameters to changes in barrier function [21].  $\text{Ca}^{2+}$  depletion specifically decreased Rb values, which measure paracellular permeability, had a moderate effect on alpha values, which reflect cell–matrix interactions, and had almost no effect in cell membrane capacitance (Fig. 3c) [21]. ECIS modelling, therefore, suggested that the main effect of  $\text{Ca}^{2+}$  removal is the disruption of cell–cell junctions that control paracellular permeability. Western blot and confocal microscopy revealed that total VE-cadherin significantly decreased when physiological levels of  $\text{Ca}^{2+}$  were replenished, even though the cell monolayer recovered its barrier properties 60 min after replenishment (Figs. 3d–f and S3A, B). In contrast, the levels of PECAM-1, another junctional protein, remained unaltered during barrier contraction and reformation (Fig. 3d and S3C). These results suggested the involvement of other junctional components in the initial stages of barrier reformation. Indeed, tight junctions, detected by staining with antibodies specific for ZO-1, were fully reformed 60 min after  $\text{Ca}^{2+}$  restoration (Fig. 3g, left). N-cadherin is highly expressed in human endothelial cells and does not localize at mature endothelial cell–cell contacts since it mediates heterotypic interactions between the basal membrane of endothelial cells and vascular smooth muscle cells and pericytes [17, 22, 23]. Sixty min after  $\text{Ca}^{2+}$  restoration, N-cadherin partially decorated endothelial cell–cell junctions (Fig. 3g, right), suggesting that junctional complexes other than those mediated by VE-cadherin participate in the early recovery of cell–cell contacts after acute barrier disruption. Alternative  $\text{Ca}^{2+}$ -switch assays, carried out by adding EDTA to the endothelial medium, also induced a decrease in VE-cadherin expression levels 60 min after  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment (Fig. S3A, B). In addition, proteasomal inhibition had little effect on total VE-cadherin decrease, but combinations of proteasomal and ADAM-10 inhibitors prevented VE-cadherin decrease (Fig. S3C). Together, these results indicate that barrier repair after acute disruption engages VE-cadherin in a route of degradation and shedding that continues even when cell–cell junctions are being reannealed.

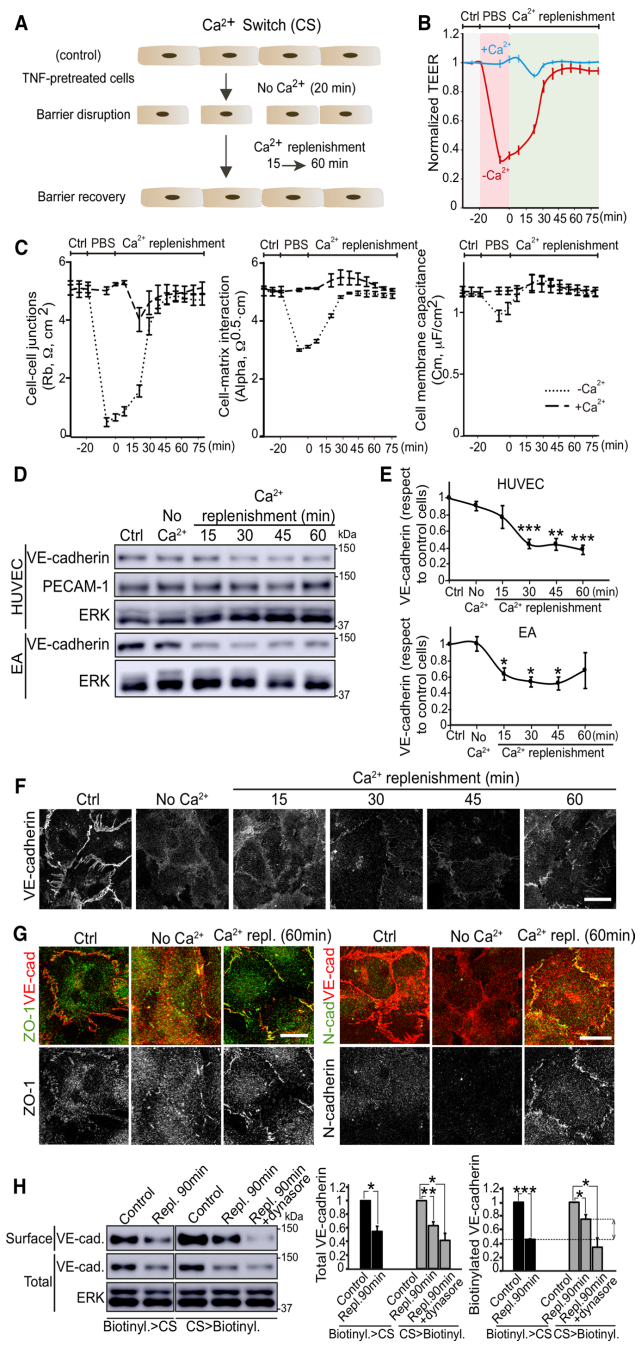
To establish whether the intracellular pool of VE-cadherin found in  $\text{TNF}\alpha$ -treated cells (Fig. 2b) participates in the regulation of surface VE-cadherin turnover during the  $\text{Ca}^{2+}$  switch assays, we performed surface biotinylation experiments in combination with  $\text{Ca}^{2+}$ -depletion assays.

To better detect intracellular VE-cadherin translocation to the cell surface, barrier recovery was prolonged up to 90 min. First, cells were biotinylated and then subjected to  $\text{Ca}^{2+}$  switch assays (Fig. 3h, biotinylation > CS). The reduction of surface and total levels of VE-cadherin during  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment was compared, revealing that surface and total VE-cadherin disappeared at a similar rate. Then reciprocal experiments were carried out in parallel: cells were subjected or not to  $\text{Ca}^{2+}$  switch assays and then biotinylated after  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment (Fig. 3h, CS > biotinylation). Total VE-cadherin levels decreased at a similar rate in the two types of experiments. However, biotinylated VE-cadherin levels detected during  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment when biotinylation was performed after  $\text{Ca}^{2+}$  switch (CS > biotinylation) were significantly higher than those in cells subjected to biotin labeling before  $\text{Ca}^{2+}$  depletion (biotinylation > CS) (Fig. 3h, surface, right graph, double arrowheads). This difference in VE-cadherin biotinylation during  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment between the two sets of parallel experiments indicates that a significant proportion of surface VE-cadherin detected after barrier reformation was not at the plasma membrane before the  $\text{Ca}^{2+}$  switch assay, and thus may correspond to the intracellular pool found in Fig. 2b. Indeed, inhibition of intracellular trafficking with Dynasore reduced total VE-cadherin expression and the presence of VE-cadherin at the cell surface during barrier recovery (Fig. 3h, right graph). In conclusion, our experiments suggest that endothelial cells partially compensate VE-cadherin protein reduction induced by acute disruption by translocating the intracellular pool of VE-cadherin during barrier reformation.

### The NF- $\kappa$ B pathway mediates VE-cadherin expression and maintains endothelial barrier integrity

VE-cadherin is fundamental to the preservation of endothelial cell–cell contacts as well as to endothelial cell survival [5]. Reduction of VE-cadherin levels leads to massive collapse of the endothelial barriers in vitro [1, 13] and of some vascular beds in vivo [5]. Therefore, compensation of VE-cadherin degradation through its synthesis must be an essential mechanism for increasing permeability without compromising endothelial barrier integrity, for instance, by a surge in apoptosis [5]. We gained further insight into the  $\text{TNF}\alpha$ -mediated increase of the intracellular VE-cadherin pool by investigating whether it involves transcriptional activation of the *CDH5* gene. First, RT-qPCR analysis of a time course of  $\text{TNF}\alpha$  stimulation showed an increase in the levels of VE-cadherin mRNA, similar to that observed at the protein level (Fig. 4a). In addition, the use of a panel of inhibitors suggested that  $\text{TNF}\alpha$  raises VE-cadherin expression through a NF- $\kappa$ B-dependent pathway but not through a JNK-dependent pathway (Fig. 4b, c). Consistent with





**Fig. 3** An intracellular VE-cadherin pool partially compensates surface VE-cadherin decrease upon acute barrier disruption **a**, **b** HUVECs were cultured at confluence for 48 h on dishes pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated with 10 ng/ml TNF $\alpha$  for 24 h before performing a Ca<sup>2+</sup> switch (CS) assay, which induces a transient and acute disruption of the cell monolayer in absence of Ca<sup>2+</sup> and a subsequent recovery upon Ca<sup>2+</sup> replenishment with EBM-2 endothelial culture medium. **b** ECIS analysis of the transient effect of Ca<sup>2+</sup> switch on TEER. PBS with no Ca<sup>2+</sup> induces a strong decrease in TEER, whereas PBS containing 1 mM Ca<sup>2+</sup> has no effect. **c** ECIS mathematical modelling of the TEER analysis in **(b)** yields three values: Rb values, which reveal changes in paracellular permeability (left), Alpha values, which are proportional to changes in cell–matrix interactions (center), and Cell membrane capacitance (right) [21]. **d** Analysis of VE-cadherin expression levels during the CS assay in HUVECs and EA.hy926 (EA) detected by western blot. **e** Graphs show VE-cadherin expression levels with respect to control cells from at least three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . **f** VE-cadherin distribution in HUVECs during the CS assay. Scale bar, 20  $\mu$ m. **g** ZO-1 and N-cadherin distribution with respect to VE-cadherin staining during the CS assay. Scale bar, 20  $\mu$ m. **h** TNF $\alpha$ -pretreated cells were biotinylated before or after a CS assay. Control cells and cells recovering after 90 min of Ca<sup>2+</sup> replenishment were lysed and biotinylated proteins isolated by pull-down with NeutrAvidin-agarose beads. Graphs show the quantification of total and surface VE-cadherin levels from three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . ERK was immunoblotted as a loading control. Double arrowhead shows differences in surface VE-cadherin during Ca<sup>2+</sup> replenishment when cells were biotinylated before and after CS, which correspond to the surface localization, after barrier reformation, of VE-cadherin molecules that were not at the cell surface before the CS assay (right graph). To test whether VE-cadherin localization at the cell surface requires intracellular trafficking, parallel experiments of CS>biotinylation where performed in the presence of Dynasore during Ca<sup>2+</sup> replenishment. See also Fig. S3

its inhibitory effect on VE-cadherin expression, treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY11 induced the collapse of the endothelial barrier as measured in TEER experiments and transwell permeability assays, in a similar manner to the barrier disruption induced upon VE-cadherin blockage with specific antibodies (Figs. 4d–g and S4). This collapse was independent of TNF $\alpha$  stimulation and indicated that NF- $\kappa$ B activation is critical not only for the endothelial inflammatory response, but also for endothelial barrier homeostasis.

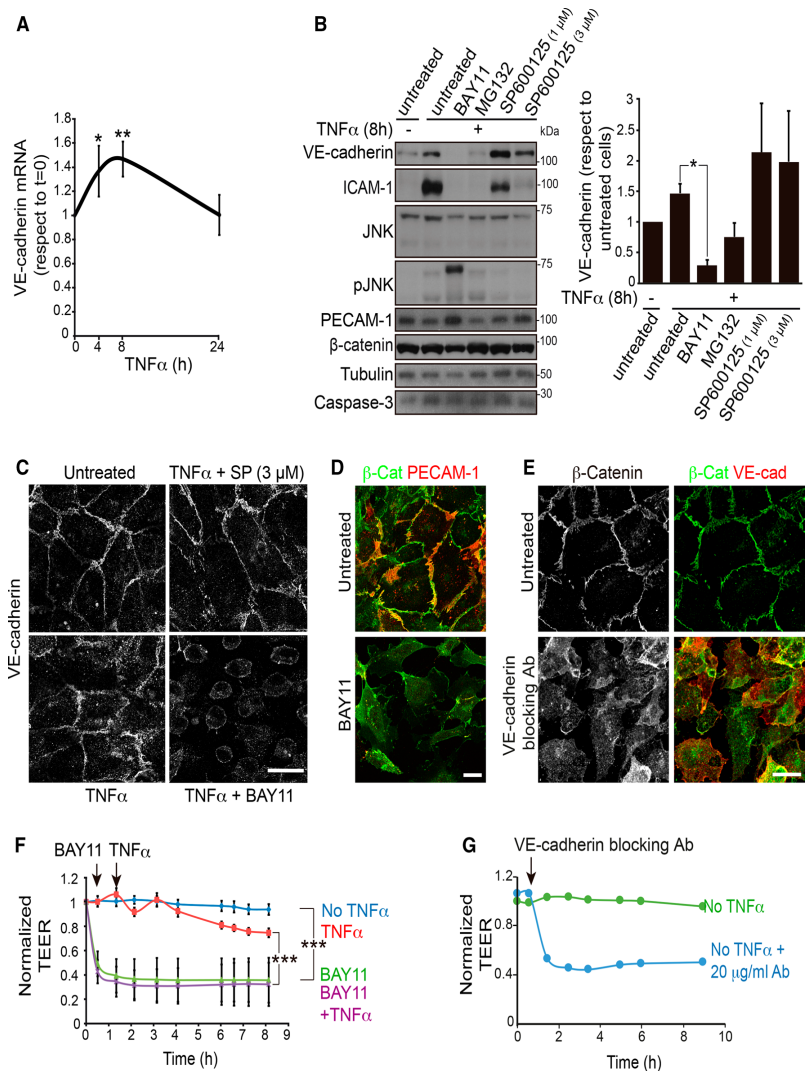
### TNF $\alpha$ and LPS increase ETS1 expression in endothelial cells

The transcription factor ETS1 controls VE-cadherin expression during endothelial cell differentiation [24, 25]. In addition, ETS1 mediates proinflammatory responses in diseases such as rheumatoid arthritis and vascular injury [26–28]. This prompted us to test the effect of TNF $\alpha$  on ETS1 expression in human endothelial cells. TNF $\alpha$  induced transient ETS1 protein expression between 4 and 8 h post-stimulation (Fig. 5a). Furthermore, LPS, an endotoxin that initiates the inflammatory response in vivo by inducing cytokines

such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , induced ETS1 protein expression in HUVECs (Fig. 5b), in murine lung and kidney tissues (Fig. 5c) and in lung endothelial cells isolated from mice intraperitoneally injected with the endotoxin (Fig. 5d). Similar to VE-cadherin expression, ETS1 expression was reduced in the presence of BAY11, suggesting that ETS1 acts downstream of NF- $\kappa$ B (Fig. 5e). We attributed the reduced effect of the MG132 inhibitor to a direct effect on the degradation route of ETS1 itself that prevented its expression from being strongly inhibited.

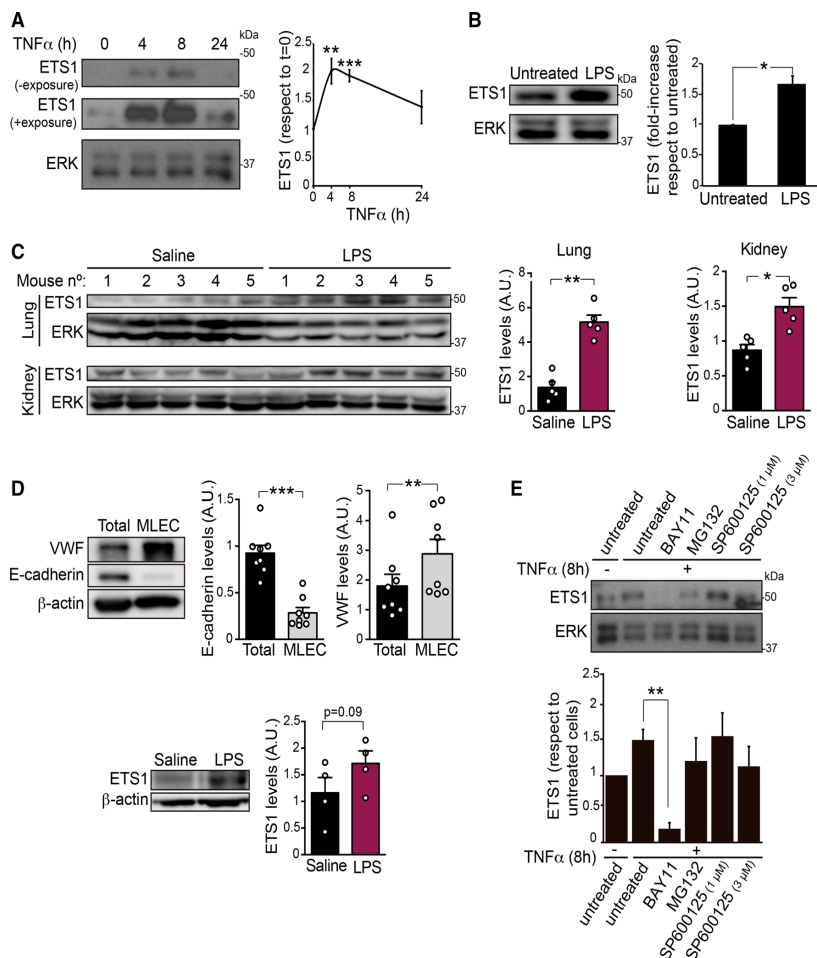
### ETS1 regulates VE-cadherin expression and paracellular permeability in response to TNF $\alpha$

siRNA-mediated *ETS1* gene silencing reduced VE-cadherin levels, indicating that VE-cadherin upregulation is mediated by this transcription factor (Fig. 6a). Indeed, TNF $\alpha$  induced similar kinetics of VE-cadherin and ETS1 expression increase (Fig. 6a). In contrast, ETS1 knockdown had no effect on ICAM-1 protein expression, a paradigmatic gene induced via NF- $\kappa$ B in response to TNF $\alpha$  (Fig. S5a), suggesting that ETS1 selectively controls VE-cadherin expression but no other NF- $\kappa$ B-regulated genes. In contrast, VE-cadherin knockdown had no effect on ETS1 expression levels (Fig. 6a). Confocal microscopy analysis confirmed that siETS1 reduced nuclear ETS1 and junctional VE-cadherin staining intensities (Fig. 6b). ETS1 nuclear translocation was coincident with the increase of VE-cadherin protein expression (Fig. 6a–c). It is of note that ETS1 depletion also reduced transient VE-cadherin accumulation in the Golgi area (Fig. 6d), although surface labelling with sulfo-NHS-biotin revealed a similar decrease of total and surface VE-cadherin levels (Fig. 6e). Unlike that of NF- $\kappa$ B, ETS1 inhibition by siRNA-mediated knockdown had no significant effect on constitutive permeability in unstimulated HUVECs and a minor effect on TEER reduction upon TNF $\alpha$  stimulation (Fig. 6f, left). However, mathematical modelling suggested that *ETS1* gene silencing specifically affects paracellular permeability in response to TNF $\alpha$  since it exacerbated the decrease of Rb values (Fig. 6f, right graph), although it had a minor effect on cell–matrix interactions, measured by alpha values, and on cell membrane capacitance (Fig. S5 B). This also indicates that the remaining VE-cadherin expression upon ETS1 depletion, or other cadherins and junctional proteins unaffected by ETS1 knockdown (not shown) can maintain constitutive permeability in the absence of inflammatory challenges [2, 4, 17]. It also suggests that VE-cadherin is the main junctional protein orchestrating barrier remodeling in response to TNF $\alpha$ . Collectively, our results show that the ETS1 transcription factor is a selective regulator of VE-cadherin expression and endothelial permeability in response to TNF $\alpha$  (Fig. 7).



**Fig. 4** NF- $\kappa$ B is necessary for VE-cadherin expression and endothelial barrier function. **a** TNF $\alpha$  increases VE-cadherin mRNA levels. RT-qPCR of VE-cadherin mRNA from HUVECs stimulated with TNF $\alpha$  for the indicated times. Graph shows the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments performed with two pairs of oligonucleotides. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01. **b** The NF- $\kappa$ B inhibitors BAY11 (10  $\mu$ M) and MG132 (20  $\mu$ M), but not the JNK inhibitor SP600125, abrogate the expression of VE-cadherin and ICAM-1 (positive control) but not of  $\beta$ -catenin, PECAM-1, tubulin and caspase-3 in HUVECs. Graph shows the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p$  < 0.05. **c** Decrease of VE-cadherin expression in the presence of the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY11 detected by immuno-

fluorescence with a specific antibody. Scale bar, 20  $\mu$ m. **d** Effect of Bay11 on endothelial cell morphology detected with anti- $\beta$ -catenin and anti-PECAM-1 antibodies. Scale bar, 20  $\mu$ m. **e** Effect of 20  $\mu$ g/ml anti-VE-cadherin blocking antibody on endothelial adherens junctions detected with anti- $\beta$ -catenin antibody. **f** The NF- $\kappa$ B inhibitor BAY11 induces endothelial barrier collapse. HUVECs were cultured at confluence for 48 h on ECIS electrodes pre-coated with fibronectin, starved for 12 h and then stimulated or not with 10 ng/ml TNF $\alpha$  in the presence or absence of 10  $\mu$ M BAY11. Graphs show the mean  $\pm$  SEM from at least three independent TEER experiments. \*\*\* $p$  < 0.001. **g** Blocking VE-cadherin with a specific antibody has the same effect than BAY11 on endothelial TEER levels



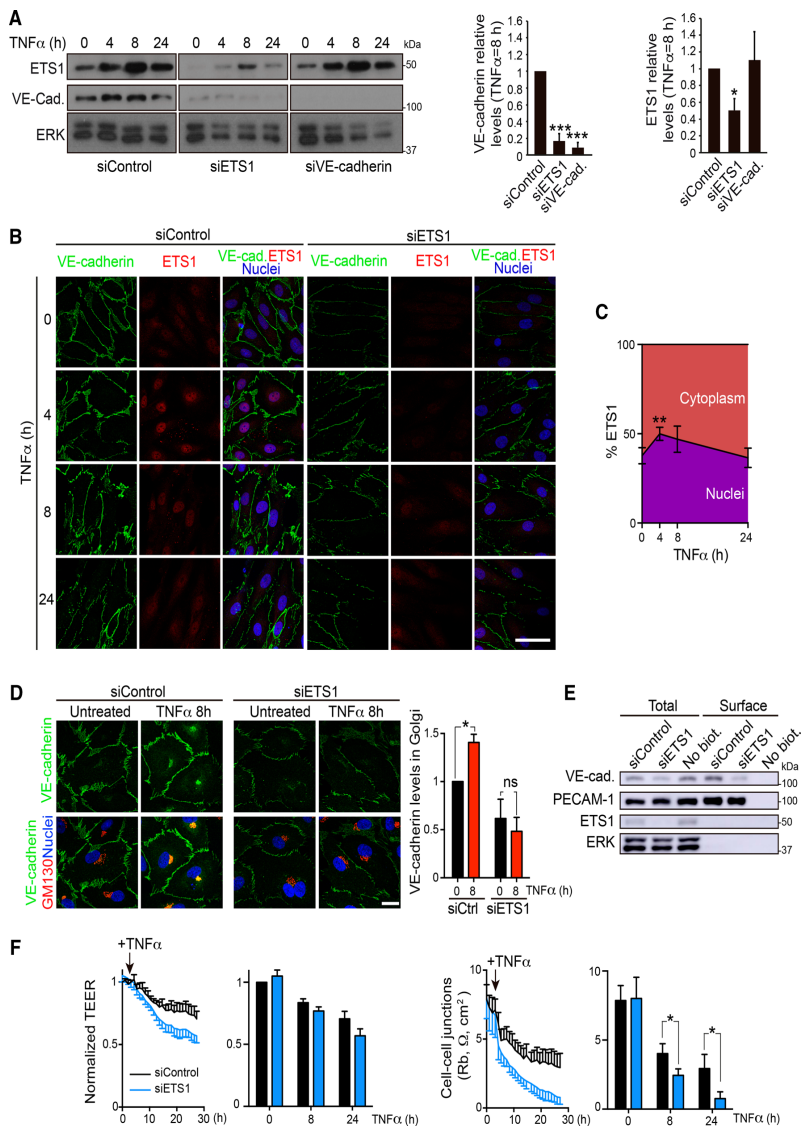
**Fig. 5** ETS1 expression increases in response to TNFα and LPS in vitro and in vivo **a** Immunodetection of ETS1 in a time course of TNFα stimulation performed as in Fig. 2. Graph shows the mean±SEM from three independent experiments. ERK was immunoblotted as a loading control. **b** Immunodetection of ETS1 in HUVECs exposed or not to 1 µg/ml LPS for 17 h. Graphs show the mean±SEM from at least three independent experiments. **c** Mice were intraperitoneally injected with 1 mg/20 g weight LPS and euthanized 18 h later. Lysates from lung and kidney were subjected to western blot analysis with the indicated antibodies. Graph shows the mean±SEM from five animals per experimental condition. ERK was

immunoblotted as a loading control. **d** An endothelial cell-enriched fraction was isolated as described (see “Materials and methods” section) and immunoblotted for von Willebrand factor (VWF) as an endothelial marker, E-cadherin as a non endothelial marker, ETS1 and β-actin as a loading control. Graph shows the quantification of ETS1 expression levels in endothelial cell-enriched fractions obtained from four mice per experimental condition. **e** The NF-κB inhibitor BAY11 (10 µM) reduces the expression of ETS1 in HUVECs. ERK was blotted as a loading control. Graphs show the mean±SEM from at least three independent experiments. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001

## Discussion

Inflammatory cytokines increase endothelial permeability by inducing junctional disassembly, VE-cadherin internalization and degradation, and shedding [9, 10, 29].

Our results suggest that VE-cadherin half-life is strongly reduced from 6 h to less than 3 h by long-term TNFα exposure and that such reduction is ameliorated by proteasomal inhibition. We have also found that a combination of proteasomal and ADAM-10 inhibition clearly



prevented VE-cadherin decrease in Ca<sup>2+</sup> switch assays, which is consistent with previous observations made in dermal microvascular endothelial cells [10]. These two degradative events may coordinate VE-cadherin decrease after acute barrier disruption in an inflammatory context, similar to the two-step mechanism of calpain-mediated cleavage and intracellular degradation after internalization recently reported for VE-cadherin [30].

Although these molecular mechanisms are critical for the progressive increase of endothelial paracellular permeability, which enables a physiological inflammatory response, the loss of VE-cadherin at the cell surface can be devastating for some endothelial cell barriers. As shown here, a full VE-cadherin inhibition, either by targeting NF- $\kappa$ B or with anti-VE-cadherin-blocking antibodies, completely disrupts the endothelial monolayer. VE-cadherin expression transmits

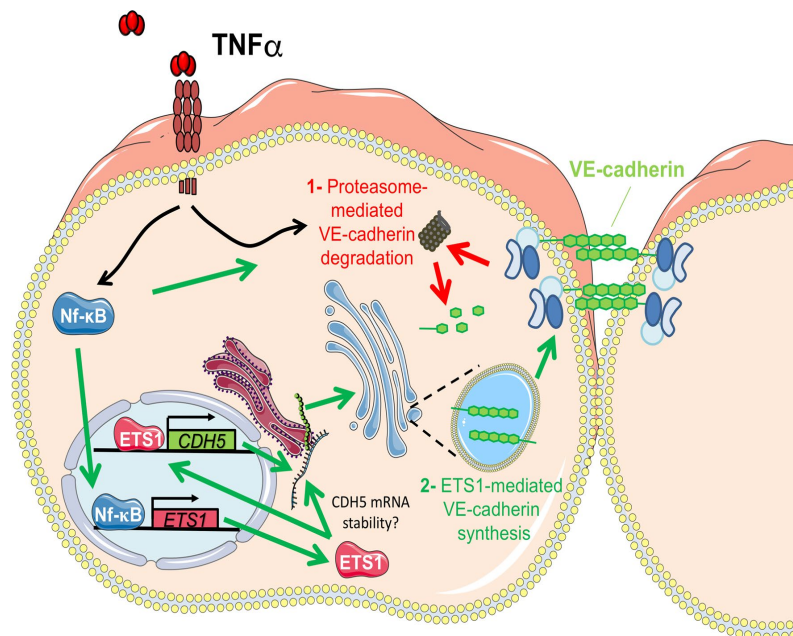
**Fig. 6** ETS1 expression is required for VE-cadherin expression and reduces TNF $\alpha$ -induced paracellular permeability **a** siRNA-mediated knockdown of ETS1 (siETS1) reduces VE-cadherin expression, whereas VE-cadherin knockdown (siVE-cadherin) does not affect ETS1 protein levels. TNF $\alpha$  induces similar kinetics of VE-cadherin and ETS1 protein expression. Graphs show quantifications of VE-cadherin and ETS1 levels with respect to siControl after 8 h of TNF $\alpha$  stimulation. Mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \* $p$  < 0.05; \*\*\* $p$  < 0.001. **b** Confocal images showing the effect of TNF $\alpha$  stimulation and ETS1 gene silencing on VE-cadherin and ETS1 levels and ETS1 nuclear translocation. Double staining was performed with rabbit anti-ETS1 antibody and mouse anti-VE-cadherin antibody against the extracellular domain of the adhesion receptor. Scale bar, 50  $\mu$ m. **c** Quantification of ETS1 nuclear translocation, which occurs mainly at 4 h of TNF $\alpha$  exposure. \* $p$  < 0.05. **d** Effect of ETS1 knockdown on VE-cadherin levels in the Golgi region. Double staining was performed with rabbit anti-VE-cadherin antibody against the cytoplasmic tail and mouse anti-GM130 antibody as a Golgi marker. Scale bar, 20  $\mu$ m. Graph shows the quantification of VE-cadherin staining in the Golgi area performed as in Fig. 2b. ns,  $p$  > 0.05; \* $p$  < 0.05. **e** Effect of ETS1 knockdown on total and surface VE-cadherin levels. HUVECs were transfected with the indicated siRNA oligonucleotides. 72 h post-transfection, cells were labeled with sulfo-NHS-biotin and surface, biotinylated proteins isolated by pull-down with NeutrAvidin agarose as in Fig. 2a. Note that siETS1 has no effect on the total and surface levels of PECAM-1 and on the loading control ERK. **f** Effect of ETS1 knockdown on TEER decrease (left graph) and Rb value decrease (right) induced by TNF $\alpha$  [21]. Graphs show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments measured at the indicated times of TNF $\alpha$  stimulation. \* $p$  < 0.05. See Fig. S5B

prosurvival signaling that prevents endothelial apoptosis through its interaction with  $\beta$ -catenin [5] or by controlling the expression of survivin, a member of the family of inhibitors of apoptosis (IAP) involved in survival and differentiation that is upregulated in many cancers [31]. Hence, it is likely that endothelial cells, particularly those from large vessels such as HUVECs, establish molecular mechanisms to ensure enough VE-cadherin molecules at their plasma membrane, thus preserving barrier integrity and cell survival even when endothelial permeability is increased and AJs are transiently destabilized in an inflammatory scenario. Our results indicate that the progressive, TNF $\alpha$ -mediated VE-cadherin degradation can be compensated by an increase of VE-cadherin synthesis. This compensation induces VE-cadherin accumulation in an intracellular compartment, which also partially contributes to surface VE-cadherin restoration during acute contraction (Fig. 7). Experiments comparing levels of cell surface VE-cadherin by labeling cells with biotin before and after inducing acute contraction suggest an active vesicular trafficking of VE-cadherin from an intracellular pool towards the plasma membrane during barrier reformation. This is consistent with other studies showing the important role for intracellular VE-cadherin trafficking from endosomal compartments in endothelial barrier remodeling in response to various stimuli [16, 32–34]. Although we found that VE-cadherin accumulates in a Golgi/trans-Golgi

network compartment, the identity of the vesicular carriers sorting newly synthesized cadherin towards the endothelial plasma membrane, and their potential connection to recycling endosomes remains to be investigated. It is of note that VE-cadherin is not essential for maintaining endothelial barrier function in all tissues and type of vessels [35, 36]. This suggests that other endothelial junctional complexes, including different cadherin-mediated junctions that are still poorly investigated, may play major roles in maintaining cell–cell contacts since many other cadherin superfamily members are expressed in human endothelial cells [22]. Our observation that complete endothelial barrier reformation occurs while VE-cadherin is still engaged in a degradative route, as well as the detection of newly formed tight junctions and N-cadherin-mediated junctions in early and probably immature cell–cell contacts, is in agreement with the existence of a wider than expected range of endothelial cell–cell junctional complexes that contribute to dynamically regulate vascular and lymphatic barrier function in different physiological and pathological situations.

In addition, we have found that ETS1 selectively mediates compensatory VE-cadherin synthesis, but not the synthesis of other TNF $\alpha$ -regulated genes, such as ICAM-1. Although further transcriptomic analysis on the role of ETS1 in the inflammatory response of human mature endothelium should be carried out, our data indicate that ETS1 may constitute part of the transcriptional hub that controls compensatory responses during NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory signaling. ETS1, one of the main transcription factors controlling endothelial differentiation and cell density [24, 37], is strongly augmented by TNF $\alpha$  in human mature endothelial cells. Our results show that endothelial responses to inflammatory signaling share common transcriptional features with endothelial cell differentiation, in which the transcription of genes such as CD31 and VE-cadherin is upregulated. Indeed, a paradigmatic overlapping mediated by TNF $\alpha$  between inflammatory and differentiation signaling is found in macrophage-induced differentiation of stem/progenitor cells into endothelial cells. TNF $\alpha$  secretion facilitates the upregulation of VE-cadherin expression via TNF $\alpha$ -receptor-1 and NF- $\kappa$ B in these progenitor cells. The direct binding of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B to the VE-cadherin gene promoter region was identified, indicating that, in addition to ETS1, NF- $\kappa$ B also directly regulates *CDH5* gene transcription [38]. Likewise, ETS1 mediates peripheral blood stem cell commitment to the endothelial lineage [24] and two ETS1 binding sites can be found in the proximal region of the *CDH5* promoter, necessary for VE-cadherin expression. These two sites bind ETS1 in vitro and are able to mediate the transactivation of a reporter by ETS1 [37]. The role of all these regulatory elements has not been investigated before in the context of the mature endothelial inflammatory response





**Fig. 7** Endothelial cells compensate for reduction of surface VE-cadherin half-life by expressing VE-cadherin in response to TNFα. Schematic model of the molecular mechanisms by which endothelial cells maintain enough VE-cadherin levels at the plasma membrane

when permeability increases in response to TNFα. TNFα induces (1) proteasome-mediated VE-cadherin degradation and, (2) ETS1-mediated VE-cadherin synthesis, which may be caused by ETS1-induced CDH5 gene transcription or by increasing CDH5 mRNA stability

but, collectively, these previous reports and our results clearly indicate that the VE-cadherin promoter is regulated by inflammatory transcription factors, which participate in stem cell–endothelial differentiation and, as shown here, in endothelial barrier function.

The intensity, space and time of the physiological inflammatory response must be finely tuned to induce partial remodeling, but not destruction, of vessels and tissues. The molecular analysis of inflammation has mainly focused on the proteins causing endothelial leakage. It is only more recently that researchers have realized the importance of investigating the mechanisms that counteract such barrier disruption and, in general, the inflammatory response [39]. In addition, the inflammatory response can also be considered as a cellular stress response, upon which cells trigger homeostatic signaling. We propose that the observed upregulation of VE-cadherin and ETS1 expression via NF-κB is part of the transcriptional program that endothelial cells implement to tune vascular remodeling, preserve barrier integrity and recover vascular homeostasis in an inflammatory context.

## Materials and methods

### Materials

Mouse anti-VE-cadherin (610252), mouse anti-VE-cadherin blocking antibody (610251), mouse anti-p120-catenin (610134), mouse anti-E-cadherin (610181) and rat anti-mouse CD102 (553326) antibodies were purchased from BD. Rabbit anti-ICAM-1 (sc-7891), rabbit anti-ERK-1/2 (sc-94), mouse anti-GM130 (sc-16268), mouse anti-PECAM-1 (sc-365804), mouse anti-tubulin (sc-134241) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Rabbit anti-VE-cadherin (D87F2), rabbit anti-JNK (9252), rabbit anti-pJNK (9251) and rabbit caspase-3 (9662) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology. Rabbit anti-β-catenin (C-2206) antibody, mouse anti-N-cadherin (C3865) and mouse anti-β-actin (A-5441) antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Mouse anti-VE-cadherin (BV6) antibody was obtained from Enzo Life Sciences. Mouse anti-GAPDH (AB-82-45)

and mouse anti- $\alpha$ -catenin (EP1793Y) antibodies were purchased from Abcam. Mouse anti-Plakoglobin (PG-11E4) and rabbit ZO-1 (40-2200) antibodies were obtained from Thermo-Fischer. Phalloidin-Alexa 647 (A-22287) was obtained from Invitrogen. Rabbit anti-von Willebrand Factor antibody (A0082) was purchased from Dako. DAPI (10236276001) was obtained from Roche. Goat-anti-mouse and goat-anti-rabbit secondary antibodies were conjugated to Alexa Fluor-488, -555 and -647 and were purchased from Thermo-Fischer. Western blot secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch (donkey-anti-goat, 705-036-147 and donkey-anti-mouse, 715-035-151) and GE Healthcare (anti-rabbit, NA934 V). BAY11 (B5556), MG132 (M8699), SP600125 (S5567), chloroquine phosphate (C6628), ammonium chloride (A9434), GI254023X (SML0789) and LPS (L8274) were purchased from Sigma-Aldrich. Lactacystin (sc-3575) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Recombinant human TNF $\alpha$  (210-TA/CF) was obtained from R&D Systems.

### Plasmids, siRNA, and RT-qPCR analysis

The following siRNA oligonucleotides were obtained from Dharmacon: siControl1 (nontargeting control), D-001210-01, 5'-AUGUAUUGGCCUGUAUAGUU-3'; siControl3 (nontargeting control) D-001810-01, 5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' were used individually or as a pool; siRNA for VE-cadherin (NM\_001795) 5'-GGAACGAGAUGCACAUUGA-3'. siRNA for ETS1 was a SMARTpool (M-003887J, consisting of a pool of 4 oligonucleotides: 5'-GAUAAAUCCUGUCAGUCUU-3'; 5'-GGACCGUGCUGACCUCAAU-3'; 5'-GGAAUUAUCACUGAUAA-3' and 5'-GCAUAGAGAGCUACGAUAG-3'. siRNA oligonucleotides were transfected with Oligofectamine (Invitrogen) as previously described [1]. Oligonucleotides for qPCR were purchased from Sigma-Aldrich. 1  $\mu$ g RNA from HUVECs was subjected to reverse transcription with the High-Capacity RNA-cDNA kit (Applied Biosystems). RT-qPCR was performed from the resulting cDNA in a CFX 384 thermocycler (Bio-Rad) using the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) and forward and reverse primers, designed with ProbeFinder software (Roche). Parallel qPCR for the housekeeping genes  $\beta$ -actin and GAPDH; F: 5'-CAGGCACACAGGGCGTG-3', R: 5'-GTGAGGATGCCTCTCTTGCTCT-3', and F: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3', R: 5'-CGCCCAATACGACCAAT-3' was performed to normalize data from each point of stimulation. Three replicates of all the samples were run in parallel with non-reverse transcription controls for all the targets, which yielded no detectable amplification. VE-cadherin mRNA levels changes were analyzed with two pairs of primers: F: 5'-GAACCAGATGCACATTGA

TGA-3', R: 5'-CGACTCACGCTTGACTTGAT-3', (intron spanning) and F: 5'-CAAAGACGGTCGGCTGACAU-3', R: 5'-TCTGTTCCGTTGGACTGCCT-3' (non-intron spanning) and results were pooled for quantification. Unless otherwise indicated, the quantification cycle ( $C_q$ ) values fell in the 20–24 range, which denotes medium to high levels of these transcripts. Results were quantified and represented relative to the expression of unstimulated HUVEC ( $2^{-\Delta C_q}$ ) using GenEx software, correcting for the efficiency of each pair of primers. The analyses were performed in technical triplicates. The contamination with genomic DNA was negligible. Subsequently, these values were normalized again with respect to the mean values of housekeeping genes used as reference. The stability of the candidate reference genes was probed with geNorm and Normfinder algorithms within GenEx, and a combination of the two most stable genes was chosen against which to normalize the results.

### Cell culture and transfection

HUVECs were directly extracted from umbilical cords that were either generously donated by the Clínica Ruber Internacional (Madrid), thanks to Dr. Santiago Lamas (CBMSO, Madrid), or purchased from Lonza. Late-passage HUVECs lost sensitivity to inflammatory stimulation and changes in gene expression, so cells were maintained and used during the first 4 passages and then discarded. EA.hy926 cells were a gift from C.J.S. Edgell (University of North Carolina, Chapel Hill, NC). Adult HDMVECs were purchased from Tebu-Bio. HUVECs were grown in EGM-2 medium from Lonza. EA.hy926 cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Adult HDMVEC cells were grown in CADMEC medium from Tebu-Bio. All cells were incubated in plates precoated with 10  $\mu$ g/ml human Fibronectin (Sigma-Aldrich) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air.

For siRNA transfection, HUVECs were plated at subconfluence (400,000 cells per 60 mm-dish) in EBM-2 medium (Lonza) with no antibiotics. The next day, cells were transfected by mixing 4  $\mu$ l of oligofectamine (Invitrogen) with the indicated siRNA to a final concentration of 100 nM. 24 h after transfection, cells were trypsinized and plated at confluence onto different types of dish for parallel assays, such as permeability, adhesion, immunofluorescence or western blotting [14]. Experiments were performed 72 h after transfection.

For DNA transfection, 200,000 HUVECs were seeded on fibronectin-coated coverslips in 24-well dishes and were transfected with a mixture of 4  $\mu$ g poly-ethylene-imide (PEI, Polysciences, Inc.) and 2  $\mu$ g of plasmid DNA per coverslip. Medium was replaced 24 h after transfection, and experiments were performed 48 h after transfection.



### Calcium switch assay

Interendothelial junctions depend on VE-cadherin homophilic interactions, which, in turn, rely on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  availability [6]. To induce massive inter-endothelial junctions rupture and surface protein internalization, we performed transient  $\text{Ca}^{2+}$  depletion assays, which consisted of replacing the culture medium with phosphate buffer saline (which does not contain  $\text{Ca}^{2+}$ ) for 20 min, followed by the addition of fresh  $\text{Ca}^{2+}$ -enriched culture medium to induce cell–cell contact recovery. When indicated, cells were incubated with 60  $\mu\text{M}$  Dynasore (Calbiochem) during  $\text{Ca}^{2+}$  replenishment. Alternatively,  $\text{Ca}^{2+}$  depletion was induced by adding 3 mM EDTA to the culture medium.

### Biotinylation assays for surface protein detection and western blot

We labeled cells with EZ-Link sulfo-NHS-biotin (Thermo Scientific) to detect surface-associated proteins [15]. In brief, we incubated HUVEC monolayers in 60-mm dishes with a solution of 0.1 mg/ml of sulfo-NHS-biotin in PBS supplemented with 1.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  for 30 min. Biotinylation was performed at 4 °C to block membrane trafficking. Subsequently, we washed the excess of sulfo-NHS-biotin with cold PBS supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$  and incubated the cells with cold DMEM 10% FBS to quench the remaining free reagent, and then washed again. Cells were either directly lysed or, in the pulse-chase experiments, cultured at 37 °C for the indicated times and then lysed. Lysates were prepared by passing the cells through a 0.6-mm, 24G needle and then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. Part of the supernatant was conserved as total lysate and the rest was subjected to preclearing with Sepharose resin, followed by pull-down with NeutrAvidin agarose (Thermo Scientific) to isolate biotinylated proteins. Protein extraction and immunodetection procedures were performed as described previously [40]. For Western blot analysis, equal amounts of proteins were loaded onto polyacrylamide gels (8–12%) under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (EMD Millipore). After blocking with 5% nonfat dry milk or 5% BSA, the latter when western blotting of phosphorylated proteins was performed, 0.05% (vol/vol) Tween-20 in PBS, the membranes were incubated with the indicated antibodies, washed with PBS + 0.05% Tween 20, and incubated with the appropriate secondary antibodies coupled to HRP. After extensive washes, blots were developed using an enhanced chemiluminescence Western blotting kit (ECL; GE Healthcare).

### Endothelial barrier function assays

Trans-endothelial electric resistance (TEER) assays with an electric cell-substrate impedance sensing system (ECIS 1600R; Applied Biophysics) [41] were performed as described [1, 14, 18]. Unless otherwise indicated, resistance values at 4000 Hz were normalized to a value of 1.0 at the beginning of the experiments. The Rb, alpha, and membrane capacitance values (Cm) were modelled using the ECIS software (Applied Biophysics) running the experiment in the multi-frequency mode, which ranges between 250 and 64000 Hz. This mathematical modelling separates TEER values into basolateral cell adhesion (alpha), which correlates with focal adhesion formation, and paracellular barrier strength (Rb) [21]. Transwell permeability assays were performed as described [14]. Briefly, HUVECs were plated at confluence onto fibronectin-coated transwells (Corning). After 72 h, cells were treated as indicated on the top chamber of the transwell. FITC-dextran (Mr 4000, Sigma-Aldrich) was applied on the top chamber at 0.1 mg/ml and allowed to equilibrate for 90 min before a sample from the medium at the lower chamber was collected to measure fluorescence in a Fusion  $\alpha$ -FS fluorimeter.

### Antibody-mediated labeling of surface VE-cadherin: confocal and time-lapse microscopy

For confocal microscopy, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, blocked with TBS (25 mM Tris, pH 7.4, and 150 mM NaCl) plus 10 mM Gly for 10 min, permeabilized for 5 min with TBS containing 0.2% Triton X-100 at 4 °C, blocked with TBS containing 3% BSA for 30 min and incubated at 37 °C with primary antibodies and, after extensive washes, with fluorophore-conjugated secondary antibodies and Alexa Fluor 647-labeled phalloidin and/or DAPI. Surface labeling of VE-cadherin with a specific antibody was performed as described [16]. Confocal laser scanning microscopy was performed with an LSM510 (ZEISS) coupled to an Axiovert 200 M microscope, as previously described [1]. Briefly, we used 63 $\times$ /1.4 oil Plan-Apochromat and 100 $\times$ /1.3 oil Plan-Neofluar objectives to acquire images of subcellular structures. Acquisition software (LSM510 4.2) was provided by Zeiss.

Junctional VE-cadherin intensity was quantified with ImageJ. Briefly, an area containing the whole cell was created and then made 10 pixels smaller to exclude the junctional region. This image was then subtracted from the original region to generate a region representing the fluorescence intensity at the cell periphery. The raw pixel intensity surface VE-cadherin was divided by the corresponding area to yield a parameter that could be compared across the different images.

## Intraperitoneal injection of LPS

Five mice per condition were intraperitoneally injected with 50 µg/g LPS or saline. 17 h later, a retro-orbital injection of 150 µl 0.5% w/v Evans Blue (Merck) was performed as a control of LPS effect on tissue circulation. 30 min post-injection, mice were euthanized and 100 mg of lung and kidney were collected from each mouse. Evans blue was extracted with formamide at 55 °C for 48 h, measured spectrophotometrically and normalized to the tissue weight revealing an increase of tissue edema in response to LPS injection (not shown). Simultaneously, protein concentration from tissue lysates was measured with BCA protein assay (ThermoFisher) and subjected to Western blot assays with the indicated antibodies. To isolate an endothelial cell-enriched fraction [42, 43], mouse lungs were minced and digested with 0.1% type I collagenase solution (Gibco) for 1 h at 37 °C. Lung tissue was further disaggregated with a 19.5 G needle and subsequently filtered through a cell strainer. Lung cell suspension was then subjected to positive sorting with an antibody against the endothelial cell marker ICAM-2 conjugated to magnetic Dynabeads Sheep Anti-Rat IgG (11035) from Thermo Fisher, for 30 min at 4 °C. After extensive washes, endothelial cell rich fraction was lysed with Laemmli sample buffer and subjected to western blot analysis.

## Statistical analysis

Statistical significance was determined using the paired two-tailed Student *t* test in PRISM and Microsoft Excel.

**Acknowledgements** The expert technical advice of the Confocal Microscopy Facility and the Genomic Facility are gratefully acknowledged. The work was supported by Grants SAF2017-88187-R and S2017/BMD-3817 TomoXliver (to J.M.), BFU2015-67266-R (to I.C.) and Instituto de Salud Carlos III (PI18/01662 to CR, co-funded with European FEDER contribution) and of the Programa de Actividades en Biomedicina de la Comunidad de Madrid-B2017/BMD-3671-INFL-AMUNE. S.B.F. is supported by Endocornea2, convenio colaboración CSIC, funded by Instituto de Investigación Fundación Jiménez Díaz. An institutional support of Fundación Ramón Areces to the CBMSO is also acknowledged. DGW and CCN are recipients of FPI fellowships from MINECO. NCA and AC are recipients of FPU fellowships from MECO. We also thank Dr. Phil Mason, who provided English language support, and Dr. Miguel A. Alonso, for helpful comments.

**Author contributions** DGW, NCA and JM contributed to the conception and experimental design. DGW, NCA, CCN and SBF performed the experiments and acquired the data. AC and CR help carry out in vivo experiments and isolated lung endothelial cells. DGW and NCA analyzed the data, IC and CR provided material support, and reviewed the manuscript, which was written by JM.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that no conflicts of interest exist.

## References

- Fernandez-Martin L, Marcos-Ramiro B, Bigarella CL, Graupera M, Cain RJ, Reglero-Real N, Jimenez A, Cernuda-Morollon E, Correias I, Cox S, Ridley AJ, Millan J (2012) Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:e90–e102
- Marcos-Ramiro B, Garcia-Weber D, Millan J (2014) TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb Haemost* 112(6):1088–1102
- Dejana E (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261–270
- Colas-Algora N, Millan J (2019) How many cadherins do human endothelial cells express? *Cell Mol Life Sci* 76(7):1299–1317
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147–157
- Giannotta M, Trani M, Dejana E (2013) VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 26:441–454
- Hayer A, Shao L, Chung M, Joubert LM, Yang HW, Tsai FC, Bisaria A, Betzig E, Meyer T (2016) Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat Cell Biol* 18:1311–1323
- Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, Passaniti A, Hasday JD, Goldblum SE (2006) TNF- $\alpha$  increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L1232–L1245
- Gong H, Gao X, Feng S, Siddiqui MR, Garcia A, Bonini MG, Komarova Y, Vogel SM, Mehta D, Malik AB (2014) Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through  $\alpha$ 13 targeting of VE-cadherin. *J Exp Med* 211:579–591
- Flemming S, Burkard N, Renschler M, Vielmuth F, Meir M, Schick MA, Wunder C, Germer CT, Spindler V, Waschke J, Schlegel N (2015) Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res* 107:32–44
- Seynhaeve AL, Rens JA, Schipper D, Eggermont AM, Ten Hagen TL (2014) Exposing endothelial cells to tumor necrosis factor- $\alpha$  and peripheral blood mononuclear cells damage endothelial integrity via interleukin-1ss by degradation of vascular endothelial-cadherin. *Surgery* 155:545–553
- Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ (2010) The  $\text{PI3K p110}\alpha$  isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J Cell Biol* 188:863–876
- Millan J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, Correias I, Ridley AJ (2010) Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol* 8:11

14. Marcos-Ramiro B, Garcia-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollon E, Reglero-Real N, Fernandez-Martin L, Duran MC, Alonso MA, Correias I, Cox S, Ridley AJ, Millan J (2016) RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol* 213:385–402
15. Reglero-Real N, Alvarez-Varela A, Cernuda-Morollon E, Feito J, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, Gomez-Lechon MJ, Muntane J, Sandoval P, Majano PL, Correias I, Alonso MA, Millan J (2014) Apicobasal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. *Cell Rep* 8:1879–1893
16. Gavard J, Gutkind JS (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8:1223–1234
17. Navarro P, Rucio L, Dejana E (1998) Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* 140:1475–1484
18. Aranda JF, Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, Ruiz-Saenz A, Fernandez-Martin L, Bernabe-Rubio M, Kremer L, Ridley AJ, Correias I, Alonso MA, Millan J (2013) MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol Biol Cell* 24:483–494
19. Patel DM, Dubash AD, Kreitzer G, Green KJ (2014) Disease mutations in desmoplakin inhibit Cx43 membrane targeting mediated by desmoplakin-EB1 interactions. *J Cell Biol* 206:779–797
20. Toret CP, Collins C, Nelson WJ (2014) An Elmo-Dock complex locally controls Rho GTPases and actin remodeling during cadherin-mediated adhesion. *J Cell Biol* 207:577–587
21. Giaever I, Keese CR (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7896–7900
22. Colas-Algora N, Millan J (2019) How many cadherins do human endothelial cells express? *Cell Mol Life Sci* 76:1299–1317
23. Kruse K, Lee QS, Sun Y, Klomp J, Yang X, Huang F, Sun MY, Zhao S, Hong Z, Vogel SM, Shin JW, Leckband DE, Tai LM, Malik AB, Komarova YA (2019) N-cadherin signaling via Trio assembles adherens junctions to restrict endothelial permeability. *J Cell Biol* 218:299–316
24. Kim MS, Lee CS, Hur J, Cho HJ, Jun SI, Kim TY, Lee SW, Suh JW, Park KW, Lee HY, Kang HJ, Lee DS, Koh GY, Nakagami H, Morishita R, Park YB, Kim HS (2009) Priming with angiopoietin-1 augments the vasculogenic potential of the peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor through a novel Tie2/Ets-1 pathway. *Circulation* 120:2240–2250
25. Arderiu G, Pena E, Aledo R, Espinosa S, Badimon L (2012) Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* 15:657–669
26. Feng W, Xing D, Hua P, Zhang Y, Chen YF, Oparil S, Jaimes EA (2010) The transcription factor ETS-1 mediates proinflammatory responses and neointima formation in carotid artery endoluminal vascular injury. *Hypertension* 55:1381–1388
27. Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, Meehan WP, Collins A, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2001) TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 159:93–101
28. Redlich K, Kiener HP, Schett G, Tohidast-Akrad M, Selzer E, Radda I, Stummvoll GH, Steiner CW, Groger M, Bitzan P, Zenz P, Smolen JS, Steiner G (2001) Overexpression of transcription factor Ets-1 in rheumatoid arthritis synovial membrane: regulation of expression and activation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 44:266–274
29. Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Turnage RH, Sarosi GA, Terada LS (2002) Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery* 132:180–185
30. Su W, Kowalczyk AP (2017) The VE-cadherin cytoplasmic domain undergoes proteolytic processing during endocytosis. *Mol Biol Cell* 28:76–84
31. Iurlaro M, Demontis F, Corada M, Zanetta L, Drake C, Gariboldi M, Peiro S, Cano A, Navarro P, Cattellino A, Tognin S, Marchisio PC, Dejana E (2004) VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *Am J Pathol* 165:181–189
32. Yan Z, Wang ZG, Segev N, Hu S, Minshall RD, Dull RO, Zhang M, Malik AB, Hu G (2016) Rab11a mediates vascular endothelial-cadherin recycling and controls endothelial barrier function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:339–349
33. Yang J, Yao W, Qian G, Wei Z, Wu G, Wang G (2015) Rab5-mediated VE-cadherin internalization regulates the barrier function of the lung microvascular endothelium. *Cell Mol Life Sci* 72:4849–4866
34. Chichger H, Duong H, Braza J, Harrington EO (2015) p18, a novel adaptor protein, regulates pulmonary endothelial barrier function via enhanced endocytic recycling of VE-cadherin. *FASEB J* 29:868–881
35. Frye M, Dierkes M, Kuppers V, Vockel M, Tomm J, Zeuschner D, Rossaint J, Zarbock A, Koh GY, Peters K, Nottebaum AF, Vestweber D (2015) Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med* 212:2267–2287
36. Hagerling R, Hoppe E, Dierkes C, Stehling M, Makinen T, Butz S, Vestweber D, Kiefer F (2018) Distinct roles of VE-cadherin for development and maintenance of specific lymph vessel beds. *EMBO J* 37:e98271
37. Lelievre E, Mattot V, Huber P, Vandenbunder B, Soncin F (2000) ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19:2438–2446
38. Wong MM, Chen Y, Margariti A, Winkler B, Campagnolo P, Potter C, Hu Y, Xu Q (2014) Macrophages control vascular stem/progenitor cell plasticity through tumor necrosis factor-alpha-mediated nuclear factor-kappaB activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:635–643
39. Winsauer G, de Martin R (2007) Resolution of inflammation: intracellular feedback loops in the endothelium. *Thromb Haemost* 97:364–369
40. Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4:429–434
41. Tirupathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I (1992) Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7919–7923
42. Rivas V, Carmona R, Munoz-Chapuli R, Mendiola M, Noguez L, Reglero C, Miguel-Martin M, Garcia-Escudero R, Dorn GW 2nd, Hardisson D, Mayor F Jr, Penela P (2013) Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Clin Invest* 123:4714–4730
43. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002) Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 8:27–34

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



# Protein Kinase C $\zeta$ Interacts with a Novel Binding Region of G $\alpha$ q to Act as a Functional Effector\*

Received for publication, August 28, 2015, and in revised form, February 14, 2016. Published, JBC Papers in Press, February 17, 2016, DOI 10.1074/jbc.M115.684308

Guzmán Sánchez-Fernández<sup>‡§¶1</sup>, Sofía Cabezudo<sup>‡§1,2</sup>, Álvaro Caballero<sup>‡§,2</sup>, Carlota García-Hoz<sup>‡§</sup>, Gregory G. Tall<sup>||</sup>, Javier Klett<sup>‡</sup>, Stephen W. Michnick<sup>\*\*</sup>, Federico Mayor, Jr.<sup>‡§3</sup>, and Catalina Ribas<sup>‡§4</sup>

From the <sup>‡</sup>Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid, Spain, <sup>§</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, 29006-Madrid, Spain, <sup>||</sup>Department of Pharmacology, Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, 61231 Bad Nauheim, Germany, <sup>||</sup>Departments of Pharmacology and Physiology, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York 14642, and <sup>\*\*</sup>Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

Heterotrimeric G proteins play an essential role in the initiation of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling through specific interactions with a variety of cellular effectors. We have recently reported that GPCR activation promotes a direct interaction between G $\alpha$ q and protein kinase C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ), leading to the stimulation of the ERK5 pathway independent of the canonical effector PLC $\beta$ . We report herein that the activation-dependent G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  complex involves the basic PBI-type II domain of PKC $\zeta$  and a novel interaction module in G $\alpha$ q different from the classical effector-binding site. Point mutations in this G $\alpha$ q region completely abrogate ERK5 phosphorylation, indicating that G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  association is required for the activation of the pathway. Indeed, PKC $\zeta$  was demonstrated to directly bind ERK5 thus acting as a scaffold between G $\alpha$ q and ERK5 upon GPCR activation. The inhibition of these protein complexes by G protein-coupled receptor kinase 2, a known G $\alpha$ q modulator, led to a complete abrogation of ERK5 stimulation. Finally, we reveal that G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  complexes link G $\alpha$ q to apoptotic cell death pathways. Our data suggest that the interaction between this novel region in G $\alpha$ q and the effector PKC $\zeta$  is a key event in G $\alpha$ q signaling.

G-protein-coupled receptors (GPCRs)<sup>5</sup> are the largest and most versatile family of transmembrane receptors (1). Particu-

larly, Gq-coupled GPCRs mediate the action of many hormones and neurotransmitters with a paramount role in health and disease. G $\alpha$ q activates phospholipase C (PLC $\beta$ ) isoforms, which hydrolyze PIP<sub>2</sub> leading to protein kinase C (PKC) activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization (2). However, a growing body of evidence suggests that alternative effectors underlie additional, PLC $\beta$ -independent functions of G $\alpha$ q. Thus, p63RhoGEF (3) directly binds to G $\alpha$ q/11 linking GPCRs and RhoA activation. The competition between PLC $\beta$  and p63RhoGEF for binding to G $\alpha$ q indicates the existence of alternative and mutually exclusive G $\alpha$ q-initiated pathways (4). Indeed, all characterized G $\alpha$ q effectors have been shown to bind to the same region, which comprises the C-terminal half of the  $\alpha$ 2 helix (Switch II) together with the  $\alpha$ 3 helix and its junction with the  $\beta$ 5 strand (5). Additionally, the GPCR receptor kinase (GRK) 2 acts as negative regulator of G $\alpha$ q function by shielding this surface away from effectors (6).

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential downstream targets in G protein pathways. MAPKs control key cellular functions, including proliferation, differentiation, migration and apoptosis, and participate in a number of disease states including chronic inflammation and cancer (7). Recently we have described a novel signaling axis for the activation of ERK5 MAPK by Gq-coupled GPCRs in epithelial cells that is independent of PLC $\beta$  and relies on a previously unforeseen role of G $\alpha$ q as an adaptor protein through direct associations with two novel binding partners, PKC $\zeta$  and MEK5 (8). Subsequently, this novel activation mechanism for ERK5 was shown to be conserved in cardiac cells and the physiological relevance of the Gq/PKC $\zeta$ /ERK5 pathway in the development of cardiac hypertrophy programs was established using PKC $\zeta$ -deficient mice (9). In the present work we have characterized the architecture of the G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  complex in the context of the ERK5 pathway and determined that a novel interaction region underlies the ability of G $\alpha$ q to trigger the PKC $\zeta$ /ERK5 cascade and to promote apoptotic cell death.

## Experimental Procedures

**Materials**—The cDNAs of G $\alpha$ q, G $\alpha$ q-R183C, and G $\alpha$ q-Q209L were kindly provided by Dr. A. Aragay (CSIC, Barce-

\* This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2011-23800, SAF2014-55511-R), Fundación Ramón Areces, The Cardiovascular Diseases Network of Ministerio Sanidad y Consumo-Instituto Carlos III (RD12/0042/0012), Comunidad de Madrid (S-2011/BMD-2332), and Instituto de Salud Carlos III (PI11/00126, PI14/00201) (to F. M. and C. R.). This work was also supported in part by the NIGMS, National Institutes of Health Grant R01-GM088242 (to G. T.), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-GMX-231013) (to S. M.), an EMBO Short Fellowship (to G. S. F.), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER, European Union). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Recipients of FPU fellowships from the Spanish Ministry of Education.

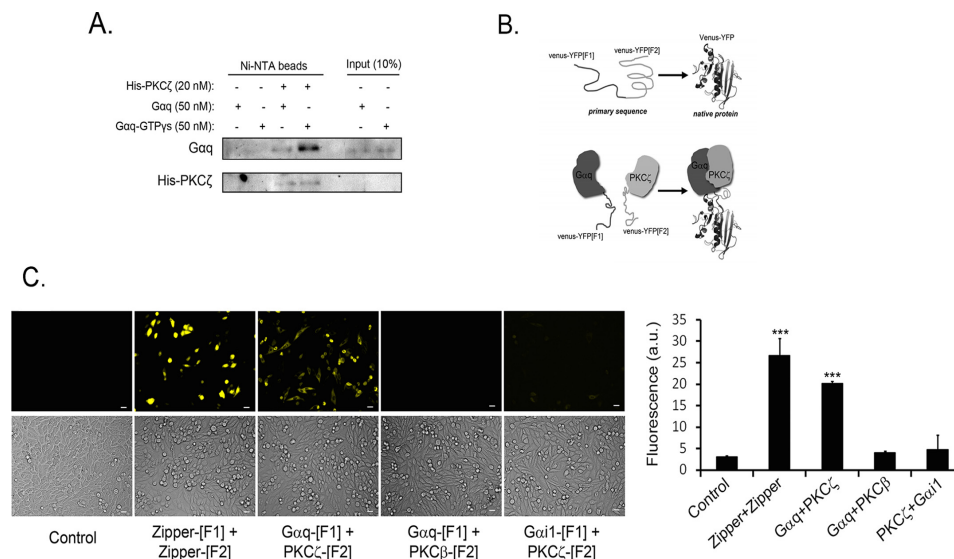
<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34-91-1964626; Fax: +34-91-964420; E-mail: fmayor@cbm.csic.es.

<sup>4</sup> To whom correspondence may be addressed: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34-91-1964640; Fax: +34-91-964420; E-mail: cribas@cbm.csic.es.

<sup>5</sup> The abbreviations used are: GPCR, G-protein-coupled receptors; PKC, protein kinase C; PI, propidium iodide; PCA, protein-fragment complementa-

tion assay; aa, amino acids; PLC, phospholipase C; GTP $\gamma$ S, guanosine 5'-O- $\gamma$ -thio]triphosphate.

# A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 1. Gαq and PKCζ interaction in vitro and in living cells.** A, PKCζ preferentially binds the GTPγS loaded form of Gαq. 20 nM of purified His-PKCζ was incubated with purified Gαq or Gαq loaded with GTPγS as detailed under "Experimental Procedures." B and C, Gαq/PKCζ complex selectivity in living cells. B, scheme of the Protein-fragment Complementation Assay (PCA, see "Experimental Procedures"). Fluorescence upon expression of the protein pair in living cells is a measure of the occurrence of an interaction between these proteins. The irreversible nature of fluorescent protein YFP-PCA assays allow for easy trapping and visualization of transient complexes. C, CHO-M3 cells were transfected with different pairs of PCA plasmids that express proteins fused to complementary N- and C-terminal fragments of Venus-YFP: Control (PKCζ-Venus YFP[F1] + pcDNA3), Zipper+Zipper (Zipper-Venus YFP[F1] + Zipper Venus YFP[F2]), Gαq + PKCζ (Gαq-Venus YFP[F1] + PKCζ-Venus YFP[F2]), Gαq + PKCβ (Gαq-Venus YFP[F1] + PKCβ-Venus YFP[F2]), PKCζ + Gai1 (Gai1-Venus YFP[F1] + PKCζ-Venus YFP[F2]). Representative bright field and YFP images at 40× magnification are shown. Bar length, 25 μm. Fluorometric analysis was performed, and data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to control (\*\*\*,  $p < 0.001$ , two tailed t test).

lona, Spain). The constitutively active Gαq mutant protein that lacks the ability to interact with PLCβ (Gαq Q209L/R256A/T257A) was provided by Dr. Richard Lin (Stony Brook University, New York). The cDNAs encoding HA-PKCζ, GST-MEK5, and HA-ERK5 have been previously described (8). The cDNAs encoding Gαq/Gai1 chimeras (Gai-ctGαq, Gαq-ctGai) were a kind gift from Dr. C. H. Berlot (Weis Center for Research). GRK2 wt and GRK2-D110A were a gift from Dr. J. L. Benovic (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA), GRK2-Y261F and W263D were a gift from Dr. T. Kozasa (University of Illinois at Chicago), the RH domain and RGS2/4 were from Dr. A. de Blasi (University of Rome "Sapienza", Italy), and the PKCζ-PB1 domain was described previously (8). Recombinant GST-ERK5 was obtained from Sigma-Aldrich. Recombinant His<sub>6</sub>-PKCζ was provided by Dr. Moscat (Sanford-Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA), and by Dr. James Hastie (Division of Signal Transduction Therapy, School of Life Sciences, MSI/WTB/JBC Complex, University of Dundee, Scotland). PKCζ-targeting and scrambled shRNA were from Sigma-Aldrich.

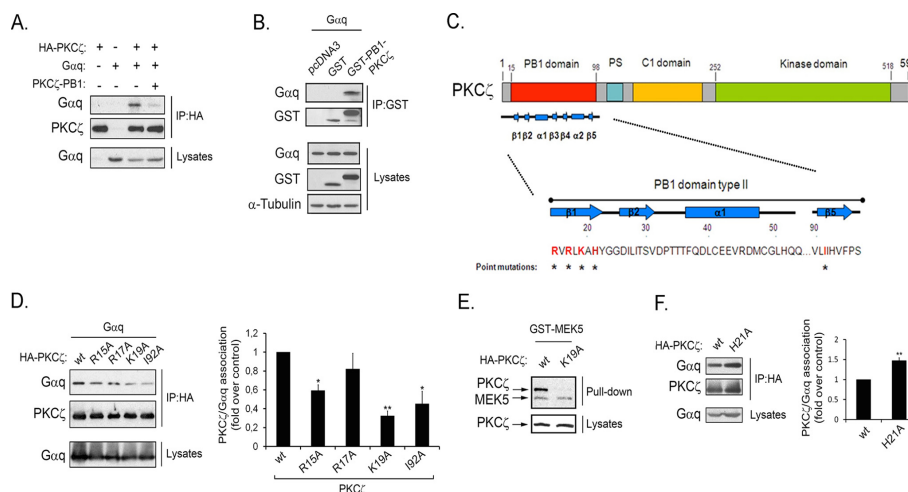
CHO cells overexpressing the muscarinic M3 acetylcholine receptor, designated CHO-M3 cells, were a kind gift from Dr. A. B. Tobin (University of Leicester, UK). COS-7, HeLa, and HEK293 cells were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Culture medium and Lipofectamine were from Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD). The affinity-purified mouse monoclonal antibody against Gαq was

from Abnova (Walnut, CA). The polyclonal antibodies against Gαq (C-19), GRK2 (C-15), ERK1 and ERK2 and GST were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Monoclonal antibodies against HA tag and Glu-Glu (EE) tag were from Covance. The anti-phospho-ERK5 antibody (p-Thr218/p-Tyr220) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Anti-ERK5 and anti-phospho ERK1/2 antibodies, anti-PKCζ, and anti-cleaved caspase-3 (Asp175) were from Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-α-tubulin was from Sigma. The anti-GRK2 antibody that recognizes the N terminus of GRK2 was generated in our laboratory. Protein-G Sepharose was obtained from Invitrogen. Carbachol was from Sigma. All other reagents were of the highest commercially available grades.

**Cell Line Culture and Treatments**—CHO cells were maintained in αMEM and HeLa, COS-7, and HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The desired cell type was stimulated with carbachol at 37 °C in serum-free medium, at the specified doses and during the indicated time periods. The cells were serum-starved before ligand addition to minimize basal kinase activity. When required, cells (70–80% confluent monolayers in 60-mm dishes) were transiently transfected with the desired combinations of cDNA constructs using the Lipofectamine/Plus method (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Empty vector was added to keep the total amount of DNA per dish constant. Assays were performed 24 h after



# A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 2. PKC $\zeta$  interacts with G $\alpha$ q through its PB1-type II domain.** *A*, overexpression of PKC $\zeta$ -PB1 domain interferes with G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  association. *B*, G $\alpha$ q co-immunoprecipitates with the PKC $\zeta$ -PB1 domain. In both panels COS-7 cells were transfected with the indicated plasmids and co-immunoprecipitation assays performed as described under "Experimental Procedures". *C*, cartoon of the PB1 type II domain of PKC $\zeta$ . Selected residues (\*), homologous to interaction-driving amino acids in other PB1-type II proteins (18), were mutated to alanine. *D*, mutations in PKC $\zeta$  PB1-type II domain interfere with G $\alpha$ q binding. COS-7 cells were transfected with G $\alpha$ q and different HA-PKC $\zeta$  mutants and subjected to co-immunoprecipitation analysis as above. Data (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  wt association (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ , two tailed  $t$  test). *E*, lysine 19 in the PB1-type II domain of PKC $\zeta$  is essential for MEK5 binding. COS-7 cells transfected with different combinations of plasmids encoding MEK5-GST, HA-PKC $\zeta$ , and HA-PKC $\zeta$ K19A and pull-downs and total lysates analyzed as in *panel B*. *F*, a mutation in the PB1-type II domain of PKC $\zeta$  enhances the interaction with G $\alpha$ q. COS-7 cells transfected with G $\alpha$ q and wild-type or HA-PKC $\zeta$ -H21A mutant constructs were analyzed as in *panels A* and *B*. To compare the association of G $\alpha$ q with the PKC $\zeta$  mutant, immunoblotted protein bands were quantified and normalized by total HA-PKC $\zeta$ . Data (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to G $\alpha$ q/PKC $\zeta$  wt association. (\*\*,  $p < 0.005$ , two tailed  $t$  test). Blots representative of three independent experiments are shown in all panels.

transfection. Transient expression of the desired proteins was confirmed by immunoblot analysis of whole-cell lysates using specific antisera.

**Cloning and Mutagenesis**—Venus-YFP expression constructs for the protein complementation assay (PCA) were obtained by sub-cloning *Gnaq* (mouse, accession number NM\_002072) and *Prkcz* (rat, accession number NM\_022507.1) into the 5'- and 3'-ends of the Venus YFP PCA fragments, referred to here as N-terminal fragment (1–158 aa; F[1]) and the C-terminal fragment (159–239 aa; F[2]), respectively, as previously described (10). PKC $\zeta$  binding-deficient mutants, G $\alpha$ q binding-deficient mutants and G $\alpha$ q constitutively active mutants were prepared using the QuickChange® site-directed mutagenesis kit (Stratagene) following manufacturer's instructions.

**Co-immunoprecipitation Assays**—24–48 h after transfection, cells were scraped and washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, solubilized in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (w/v) Triton X-100, 0.1% SDS, protease inhibitors), and clarified by centrifugation. Immunoprecipitation was performed with agarose-conjugated anti-HA antibodies (Santa Cruz Biotechnology, F-7) or, alternatively, with 1 mg/ml bovine serum albumin and anti-G $\alpha$ q (Santa Cruz Biotechnology, C19) followed by re-incubation with protein G-Sepharose. All blots were developed using the chemoluminescence method and quantified by laser-scanner densitometry.

**Pull-down Assays**—To analyze MEK5/PKC $\zeta$  binding, lysates from cells expressing GST-MEK5 (or GST alone as a negative

control) were subjected to GST pull-down assays with glutathione-Sepharose 4B as previously reported (8). In the analysis of PKC $\zeta$ -ERK5 binding, purified GST-ERK5 or GST were incubated overnight at 100 nM with 20 nM His-PKC $\zeta$  at 4 °C in binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 0.01% Lubrol, 0.6 mM EDTA, and 70 mM NaCl) supplemented with a protease inhibitor mixture. Fusion proteins were incubated for 2 h at 4 °C with glutathione-Sepharose 4B beads and washed 8–10 times with the same buffer. To explore whether PKC $\zeta$  binds to G $\alpha$ q in a GTP-dependent manner, 20 nM of purified His<sub>6</sub>-PKC $\zeta$  was incubated with Ni-NTA resin (Probond) for 2 h at 4 °C in His-Binding Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole). The mixture was then incubated with 50 nM of purified G $\alpha$ q or G $\alpha$ q loaded with GTP $\gamma$ S overnight at 4 °C in the same buffer. Recombinant protein complexes were washed 8–10 times with His-Binding Buffer supplemented with 30 mM imidazole.

**Preparation of G $\alpha$ q-GTP $\gamma$ S**—Recombinant G $\alpha$ q was purified as described (11). G $\alpha$ q-GDP (10  $\mu$ M) was incubated in a 1 ml reaction with 20  $\mu$ M purified Ric-8A (12) and 100  $\mu$ M GTP $\gamma$ S in 20 mM Hepes, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Genapol C-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM DTT for 1 h at 25 °C. The reaction was gel filtered over Superdex 75/200 columns arranged in series to separate G $\alpha$ q from Ric-8A. The monomeric G $\alpha$ q-GTP $\gamma$ S fractions were pooled, concentrated in a 10,000 MWCO Amicon Ultracentrifugal device, and stored as 20- $\mu$ M aliquots at –80 °C.

**Determination of ERK5 MAPK Stimulation**—Lysates were resolved by 8% SDS-PAGE and subjected to immunoblot anal-

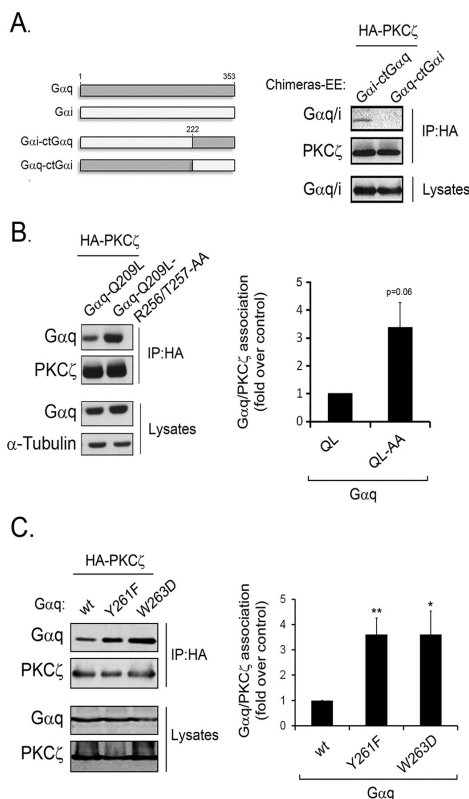
## A Novel Binding Region in Gαq

ysis as previously described (8). The activation state of ERK5 was measured by laser-scanner densitometry and expressed as the amount of phospho-ERK5 normalized to the amount of the total ERK5 protein. In CHO and HeLa cell lines HA-tagged ERK5 was transfected and immunoprecipitated with anti-HA agarose beads (Santa Cruz). Immunoprecipitates were washed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (w/v) Nonidet P-40, 0.25% (w/v) sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, supplemented with 1 mM sodium orthovanadate plus a mixture of protease and phosphatase inhibitors) at 4 °C.

**Protein-fragment Complementation Assays (PCA)**—Protein-protein complexes can be recapitulated in living cells, by fusing protein pairs to complementary N- and C-terminal fragments of a reporter (enzyme or fluorescent protein). If the proteins interact the fragments of the reporter protein will be brought into proximity where they can spontaneously fold together and reconstitute enzymatic activity or fluorescence (10). **Venus YFP-based PCA:** Cells were co-transfected with the Venus YFP PCA expression vectors coding for prey-F[1] and/or bait-F[2]. Twenty-four hours after transfection, cells were subjected to fluorometric analysis and fluorescence microscopy. For the fluorometric analysis, cells were trypsinized and resuspended in PBS, transferred to 96-well black microtiter plates (Dynex; VWR Scientific, Mississauga, Ontario), and measured in a fluorometer (integration time 10 s, excitation wavelength 470 nm, emission wavelength 528 nm) (Spectra MAX GEMINI XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Background fluorescence was subtracted from fluorometric values of all of the samples. Fluorescence microscopy was performed using a Nikon Eclipse TE2000U inverted microscope with 40× objective and YFP filter cube (41028, Chroma Technologies). Images were captured with a CoolSnap CCD camera (Photometrics) using MetaMorph software (Molecular Devices). When comparing different PCA pairs, identical microscopy settings were utilized, and the expression of each construct was assessed by Western blot to ensure that the differences observed in the fluorescence images was a due to a lack of interaction and not to insufficient expression of one of the reporters.

**xCELLigence Measurements**—The xCELLigence system RTCA SP instrument (Roche Applied Science) monitors changes in the cell index (a measure of cell attachment to the plate), which has been shown to effectively correlate to proliferation, adhesion, and viability changes (13, 14). To assess long-term viability cells were seeded in 96-well gold electrode sensor plate (E-plates) pre-coated with fibronectin (10 μM) and monitored every 15 min for at least 3 days in minimal medium (3% FBS) until an irreversible decrease (inflection point) in the cell index was recorded. Cell death was expressed as the time between the start of the experiment and the inflection point. The first 16 h after the cells were plated were excluded from each analysis as they correspond to the cell adhesion phase. In no case was cell death due to excessive confluence as confirmed by plate inspection with a microscope.

**Propidium Iodide Incorporation**—Cells were transiently transfected with the desired combinations of cDNA constructs and with GFP for the selection of the transfected population. Cells were cultured in 0.1% FBS DMEM for 48 h. If required, cells were treated with the PLCβ inhibitor U73122 (10 μM) or

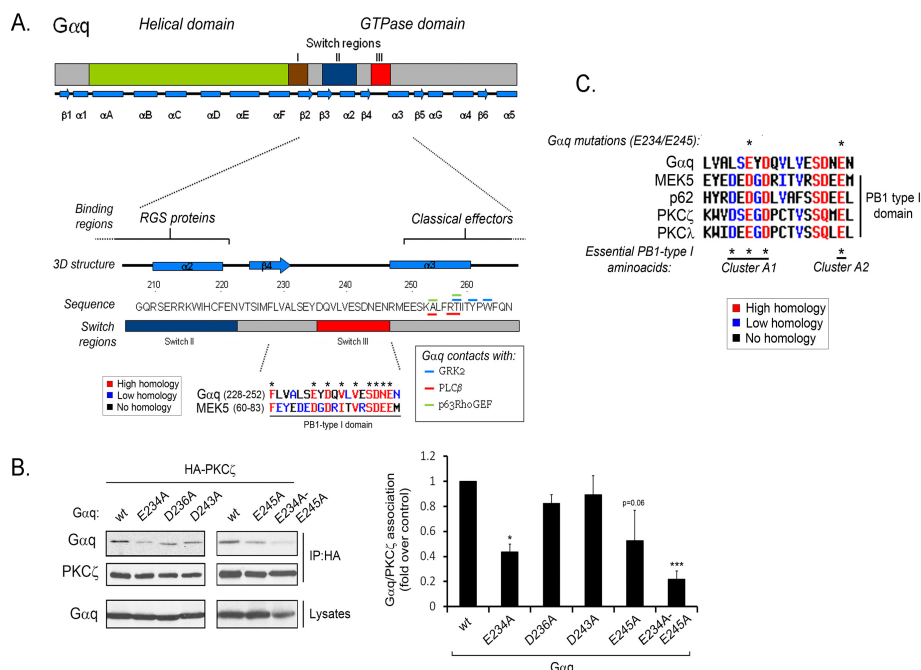


**FIGURE 3. PKC $\zeta$  does not interact with the classical effector-binding region of Gαq.** A, C terminus of Gαq (aa222–353) is essential for the interaction with PKC $\zeta$ . COS-7 cells were transfected with HA-PKC $\zeta$  and two EE-tagged chimeras: Gai-ctGαq [Gai1(1–222)-Gαq (223–253)] and Gαq-ctGai [Gαq (1–222)-Gai1 (223–253)]. B and C, mutations in Gαq impairing PLCβ/p63RhoGEF/GRK2-binding enhance the interaction with PKC $\zeta$ . COS-7 cells were transfected with HA-PKC $\zeta$  and different association-deficient mutants of Gαq (R256A/T257A mutation disrupts PLCβ (22) and p63RhoGEF (23) binding, and either Y261F or W263D mutations disrupt GRK2 binding (24)). Cell lysates and HA-PKC $\zeta$  immunoprecipitates were analyzed by Western blot as in Fig. 2. Blots representative of three independent experiments are shown in all panels. In B and C, data (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to control (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  two tailed t test).

with the ERK5 inhibitor XMD8–92 (1 μM) 24 h before staining. Cells were washed twice with PBS and resuspended in Staining Buffer (PBS 1×, 1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>, 1% FBS) with propidium iodide (PI) 1 μg/ml. Analysis was carried out in a BD FACS Calibur flow cytometer (BD-Bioscience) and GFP-positive and propidium iodide-positive cells were quantified using CellQuest Software (BD-Bioscience) and analyzed with the FlowJo Software. Within the GFP-positive population the percentage of PI-positive cells was calculated as a measure of cell death due to heterologous expression.

**Annexin V/7-AAD Binding**—To quantitatively measure apoptosis, the PE Annexin V Apoptosis Detection kit I (BD Bioscience) was utilized. Transfection and serum starving were carried out as in PI assays, after which cells were re-suspended in

# A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 4. Gαq interacts with PKCζ through a novel effector-binding region.** *A*, cartoon of the switch II/III region in Gαq showing the binding sites for RGS proteins and effectors. Important residues for Gαq interaction with PLCβ, GRK2, p63RhoGEF, or RGS proteins ((22–24)) are highlighted. A region with sequence similarities to the PB1 domain type I of MEK5, was identified at the β4 strand/β4-α3 loop of Gαq. Acidic residues in this region of Gαq were mutated to alanine. *B*, mutations in the (228–252) region of Gαq interfere with PKCζ binding. COS-7 cells were transfected with HA-PKCζ and the indicated Gαq mutants. Cell lysates and HA-PKCζ immunoprecipitates were analyzed as in previous figures. Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to PKCζ/Gαq wt association (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  two tailed *t* test). *C*, sequence analysis of the PKCζ binding region in Gαq. Glutamic acids 234 and 245 (E234/E245) of Gαq align with conserved glutamic acids from PB1-type I proteins that form two clusters (A1 and A2) that are crucial for their function as a protein-protein interaction domain. Sequence alignment of different PB1-type I domains and the β4-α3 loop of Gαq were performed with Multalin software. Sequence IDs: GNAQ mouse (NP\_032165), MEK5 mouse (Q62862), Sqstm1 mouse (p62, NM\_011018), PKCζ mouse (NM\_001039079), PKCα/i mouse (NM\_008857).

Annexin V-binding buffer (0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>) at a final concentration of  $1 \times 10^5$  cells. Samples were incubated with 2.5 μl of PE Annexin V and 5 μl of 7-AAD for 15 min at RT in the dark. Subsequently, 400 μl of binding buffer was added, and samples were analyzed by flow cytometry within 1 h on a BD FACS Calibur flow cytometer (BD-Bioscience). To determine the apoptotic stage of the different GFP-positive cell populations, 7-AAD- and Annexin V-positive cells were determined with the CellQuest Software (BD-Bioscience) and analyzed with the FlowJo Software. Cells treated with staurosporine (2.5 μM, 2 h) or ultraviolet irradiation (2 h), were considered the apoptotic (annexin V-positive) and necrotic (7-AAD-positive) controls, respectively. Within the GFP-positive population the percentage of annexin-positive cells was calculated as a measure of apoptotic cell death due to heterologous expression.

**Statistics**—Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's *t* test, as indicated in the figure legends.

## Results

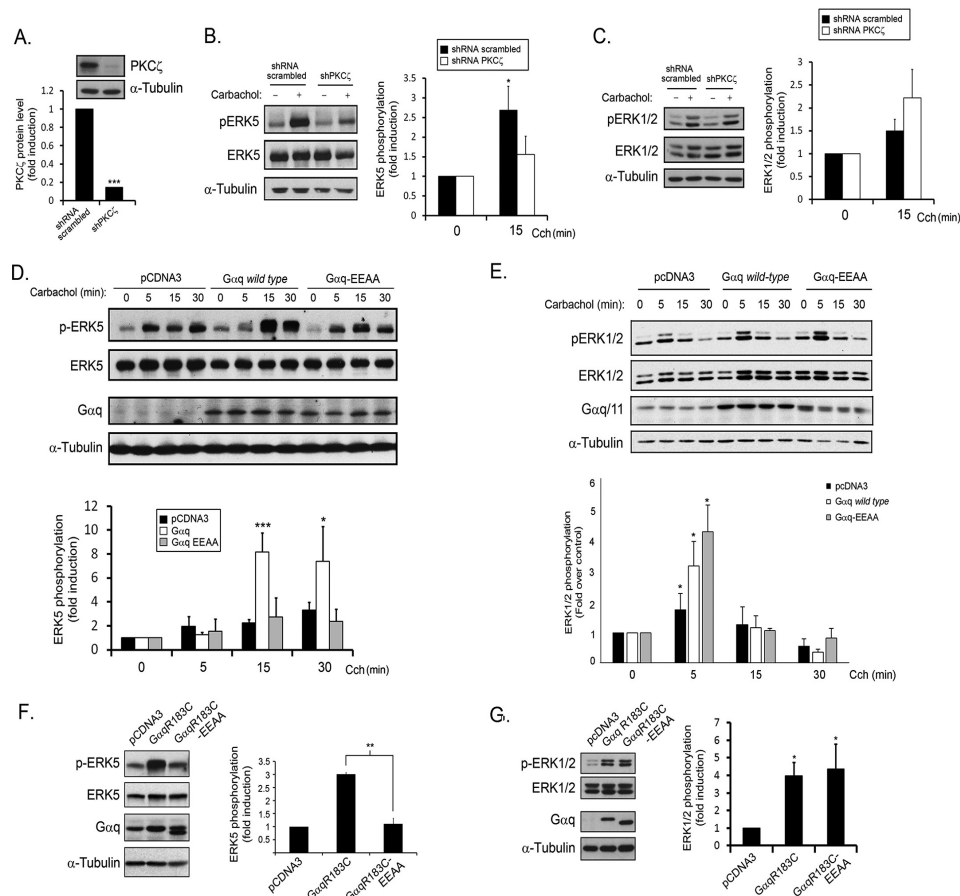
**Gαq/PKCζ Complex Formation in Vitro and in Living Cells**—The activation of the ERK5 pathway by Gq-GPCRs appears to correlate with the formation of a transient complex between

Gαq and PKCζ (8). Such interaction was suggested to be direct since these purified proteins are able to associate *in vitro*. A pull-down assay performed with purified proteins indicated that PKCζ preferentially binds the GTPγS-loaded form of Gαq (Fig. 1A). Further, the formation of a Gαq/PKCζ complex in living cells was assessed through a Protein-fragment Complementation Assay (PCA) (Fig. 1B). A clear association between PKCζ and Gαq was observed, as compared with a known high-affinity interaction (GCN4 leucine “zipper” dimerization) (Fig. 1C). The Gαq/PKCζ complex displays high specificity, since no association was detected between Gαq and another member of the PKC family, PKCβ, nor between PKCζ and another member of the Gα family (Gαi1) (Fig. 1C).

**The PB1 Domain of PKCζ Is Essential for Gαq Association**—PB1 domains are known protein-protein interaction domains, and this module alone accounts for the majority of the reported interactions of PKCζ (15). PKCζ-PB1 domain overexpression was shown to interfere with the formation of Gq/PKCζ complexes in cells, as assessed through co-immunoprecipitation assays (Fig. 2A). Indeed, the PKCζ-PB1 domain alone is able to co-immunoprecipitate with Gαq (Fig. 2B), thus suggesting that PKCζ might interact with Gαq through this module.



# A Novel Binding Region in Gαq

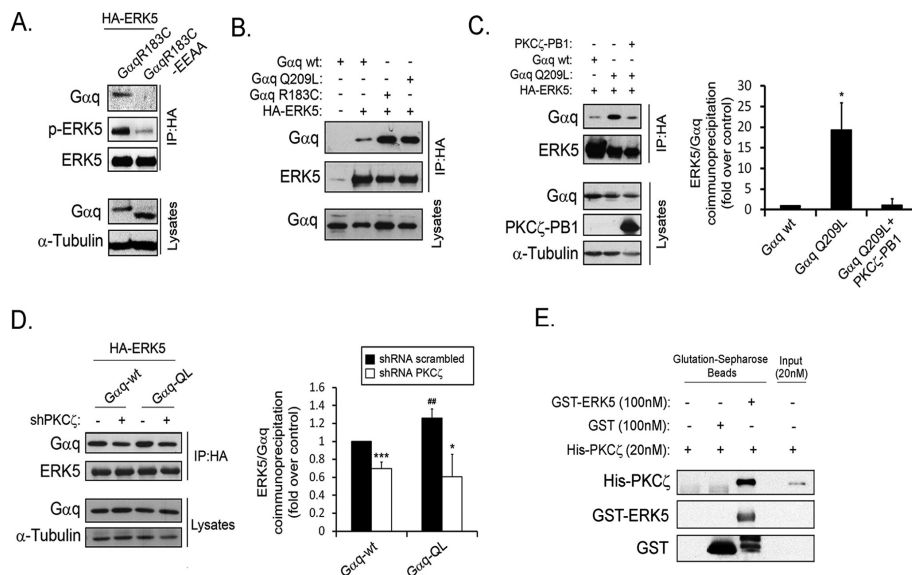


**FIGURE 5. The Gαq/PKCζ complex is involved in ERK5 activation.** A, knockdown efficiency upon transfection of a scrambled or a specific shRNA against PKCζ in CHO-M3 cells (see “Experimental Procedures”). B, PKCζ is required for ERK5 activation by a Gαq-coupled GPCR. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5, Gαq-wt, and either scrambled or PKCζ-targeting shRNA, serum-starved for 24 h and stimulated with carbachol (10 μM) for 15 min. ERK5-HA was immunoprecipitated and analyzed by Western blot. Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with total ERK5 and expressed as fold-induction of ERK5 phosphorylation over control (\*, *p* < 0.05; two tailed *t* test). C, PKCζ is not required for ERK1/2 activation by a Gαq-coupled GPCR. CHO-M3 cells transfected and stimulated as in panel B were tested for ERK1/2 activation. Representative blot of three independent experiments is shown. D and E, PKCζ association-deficient Gαq mutant cannot activate ERK5 in response to carbachol. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5, pCDNA3, Gαq or GαqE234/E245-AA (Gαq-EEAA), serum-starved for 2 h and stimulated with carbachol (10 μM). In D, ERK5-HA was immunoprecipitated and analyzed by Western blot. Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with total ERK5 and expressed as fold-induction of ERK5 phosphorylation over control (\*, *p* < 0.05; \*\*\*, *p* < 0.001, two tailed *t* test). In E, ERK1/2 activation was assessed in cell lysates as in panel C. Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized to pCDNA3 transfection (\*, *p* < 0.05, two-tailed *t* test). F and G, a constitutively active PKCζ association-deficient Gαq mutant cannot activate ERK5 whereas it fully activates ERK1/2. CHO-M3 cells were transfected with empty vector (pCDNA3) or plasmids encoding HA-ERK5 (F) and the constitutively active mutants Gαq-R183C or Gαq-R183C-E234/E245-AA (Gαq-R183C-EEAA) (both panels F and G). Samples were processed and analyzed as in D–E (\*\*, *p* < 0.01, two tailed *t* test; \*, *p* < 0.05, two tailed *t* test).

The PB1 domain of PKCζ is composed of a PB1-type I (acidic) and a PB1-type II (basic) domain (16). Since the PB1-type II domain of PKCζ has previously been involved in ERK5 activation by the EGF receptor and in MEK5 binding (17), a strategy was designed to mutate key amino acids in this region (Fig. 2C). In particular, lysine 19 (K19) seems to be an invariably crucial residue in all PB1-PB1 interactions in combination with other predominantly basic residues located nearby within the three-dimensional structure (18, 19). Remarkably, different

point mutations in the PB1-type II region and specially that in Lys-19 decreased the interaction with Gαq in co-immunoprecipitation experiments (Fig. 2D). This residue was also found to be essential for PKCζ-MEK5 binding (Fig. 2E), as predicted by other PB1-PB1 structures (19). Interestingly, another mutation within this domain (PKCζ-H21A) enhanced the ability of PKCζ to associate with Gαq (Fig. 2F). Taken together, these data indicate that the PB1 domain type II of PKCζ is crucial for binding Gαq.

# A Novel Binding Region in Gαq



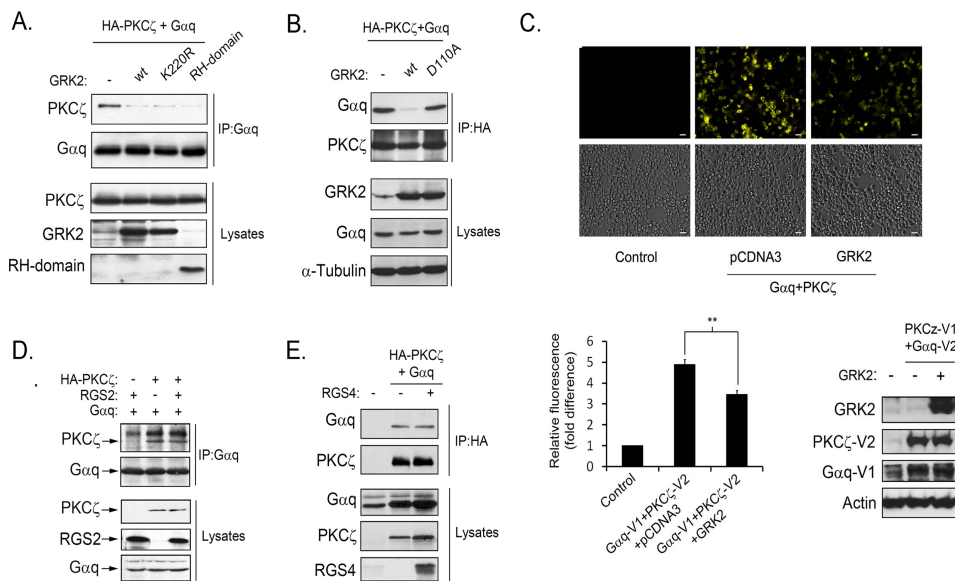
**FIGURE 6. Gαq forms an activation-dependent complex with ERK5 through PKCζ.** A and B, ERK5 preferentially co-immunoprecipitates active Gαq. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5, Gαq wt, Gαq-R183C, or Gαq-Q209L (constitutively active mutants) as indicated. Cell lysates and HA-ERK5 immunoprecipitates were analyzed as in previous figures. Representative blot of three independent experiments are shown. C, PB1 domain of PKCζ interferes with Gαq/ERK5 complexes. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5, Gαq-Q209L, and PKCζ-PB1 domain and ERK5 complexes analyzed as above (mean ± S.E. of three independent experiments) (\*,  $p < 0.05$ ). D, PKCζ silencing decreases the formation of Gαq/ERK5 complexes. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5, Gαq-Q209L, and PKCζ-targeting shRNA, and ERK5 complexes quantified as in C. Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with total ERK5 and expressed as fold-induction of co-immunoprecipitated Gαq over shRNA scrambled (\*\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , two tailed t test). E, ERK5 interacts directly with PKCζ. Fusion proteins GST-ERK5 (100 nM) and purified GST (100 nM) as negative control were incubated with His-PKCζ (20 nM) and mixtures analyzed as detailed under "Experimental Procedures." A blot representative of two independent experiments is shown.

**A Novel Region in Gαq Is Required for the Interaction with PKCζ**—Since members of the Gai family cannot interact with PKCζ (Fig. 1C and Ref. 8), we utilized two different chimeras in which the C terminus (aa 222–353) of either Gαq or Gai1 had been substituted by that of Gai1 and Gαq, respectively (20), to delineate relevant regions for PKCζ association. A Gαq chimera with the C terminus of Gai1 was unable to interact with PKCζ when expressed in cells (Fig. 3A), thus suggesting that the interaction determinants are predominantly located in the C terminus of Gαq. This C-terminal stretch includes the classical effector-binding region (21). To assess whether this region is responsible for binding PKCζ, we used different Gαq mutants unable to interact with other effectors such as PLCβ and p63RhoGEF (Gαq-R256A/T257A, (22, 23)) or GRK2 (Gαq-Y261F and Gαq-W263D (24)). Surprisingly, neither mutant affected PKCζ binding but on the contrary all co-immunoprecipitated with the kinase to a greater extent than wild-type Gαq (Fig. 3, B and C). These data suggest that the absence of competitors on the surface of Gαq favors the interaction with PKCζ. This may indicate that PKCζ is interacting with other region close to the classical effector site. We noted that the adjacent β4-α3 loop in Gαq displays a relatively high sequence similarity with the PB1-type I domain of MEK5, a module known to interact with the PB1-type II domain of PKCζ (Fig. 4A). A double mutation (E234/E245-AA) in the homologous residues of Gαq in this potential interaction module significantly impaired its

association with PKCζ (Fig. 4B). Interestingly, these amino acids were found to be homologous to highly conserved residues in several PB1-type I domain-harboring proteins as part of two major functional clusters (A1 and A2) (Fig. 4C) (18). Overall, these data indicate that a region of Gαq, distinct from the classical effector-binding site, is involved in the interaction with PKCζ.

**An Efficient Gαq/PKCζ Association Is Required for the Activation of the ERK5 Pathway**—We previously suggested that PKCζ is required for Gq-coupled GPCR activation of ERK5 (8, 9). To confirm this, we silenced PKCζ in CHO-M3 cells (Fig. 5A) and stimulated the cells with carbachol to reach maximum activation as previously reported (25). Activation of ERK5 was abolished in the absence of PKCζ (Fig. 5B), whereas ERK1/2 phosphorylation was seemingly unaffected (Fig. 5C). To establish whether this effect depends on the formation of a Gαq/PKCζ complex, we assessed the activation of ERK5 by the PKCζ-binding deficient mutant (Gαq-E234/E245-AA; Gαq-E234/E245-AA hereafter) in response to carbachol stimulation. Notably, overexpression of wild-type Gαq clearly enhanced ERK5 activation by GPCRs as reported (25), whereas the Gαq-E234/E245-AA mutant did not (Fig. 5D). In the same experimental setting the promotion of ERK1/2 activation was similar upon either wild-type Gαq or Gαq-E234/E245-AA expression (Fig. 5E). Consistently, the direct activation of ERK1/2 by constitutively active Gαq (R183C) was not affected by the E234/E245-AA mutation as opposed to the activation of ERK5, which was impaired (Fig. 5, F

## A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 7. GRK2 is a negative regulator of the Gαq/PKCζ complex.** A, GRK2 overexpression impairs Gαq/PKCζ association through its RH domain. COS-7 cells were transfected with HA-PKCζ and Gαq along with GRK2 wild-type, GRK2 K220R (kinase-inactive mutant) or the GRK2 RH domain. Cell lysates and Gαq immunoprecipitates were analyzed by Western blot. B, Gαq association-deficient GRK2 mutant does not interfere with the Gαq/PKCζ complex. COS-7 cells were transfected with Gαq, HA-PKCζ, GRK2 wt, and the GRK2 D110A mutant, which has impaired ability to bind to Gαq (25) and lysates and HA-PKCζ immunoprecipitates analyzed as in previous figures. C, GRK2 overexpression impairs Gαq/PKCζ association in living cells. HEK293 cells were transfected with Venus YFP PCA plasmids: Control (PKCζ-Venus YFP[F1]+pCDNA3), Gαq+PKCζ+pCDNA3 (Gαq-Venus YFP[F1]+ PKCζ-Venus YFP[F2]+pCDNA3), Gαq+PKCζ+GRK2 (Gαq-Venus YFP[F1]+ PKCζ-Venus YFP[F2]+GRK2). Data (mean ± S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to control (\*\*,  $p < 0.005$ , two tailed  $t$  test). Bar length, 25  $\mu$ m. D and E, RGS2/4 overexpression does not alter the formation of the Gαq/PKCζ complex. COS-7 cells were transfected with combinations of plasmids encoding HA-PKCζ, Gαq, and RGS2 or RGS4. Either Gαq (D) or HA-PKCζ (E) immunoprecipitates and total lysates were analyzed as above. In all panels, blots shown are representative of 2–3 independent experiments.

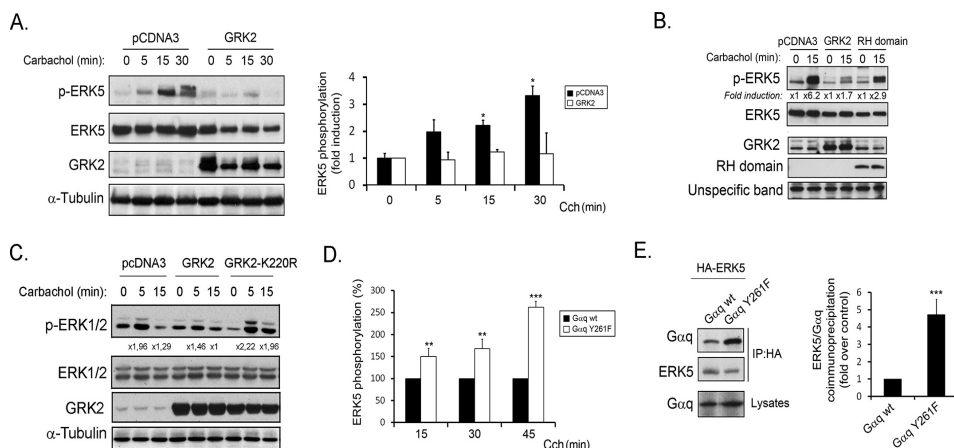
and G). These results indicate that this mutant retains the ability to modulate the activity of other Gαq effector proteins and support the specificity of the Gαq/PKCζ axis in promoting ERK5 activation.

**PKCζ Scaffolds an Activation-dependent Gαq/ERK5 Complex**—Interestingly, Gαq was found to co-immunoprecipitate with the activated form of ERK5 and this was clearly decreased by the E244A mutation (Fig. 6A). The formation of Gαq/ERK5 complexes was greatly favored by activating mutations in the Gα subunit (R183C or Q209L) (Fig. 6B), which supports the formation of the complexes upon GPCR stimulation. We hypothesized that PKCζ could be organizing a multimolecular Gαq/ERK5 complex upon G protein activation. Both the co-expression of the PKCζ-PB1 domain or the down-regulation of PKCζ expression led to a decreased formation of Gαq/ERK5 complexes (Fig. 6, C and D). To address whether PKCζ could exert a scaffold role through a direct interaction with ERK5, we performed pull-down experiments with purified proteins and found that PKCζ and ERK5 are direct binding partners (Fig. 6E). Although other authors have suggested the occurrence of this complex (26), we provide the first concluding evidence for a direct association. Collectively, our findings suggest that PKCζ orchestrates a ternary complex with Gαq and ERK5 that underlies the activation of the signaling cascade.

**GRK2 Negatively Regulates the Gαq/PKCζ Complex and Receptor-induced ERK5 Activation**—GRK2 is a negative regulator of Gαq signaling both through receptor desensitization mechanisms and direct inhibition of Gαq-effector interactions (27). Consistently, we observed that overexpression of wild-type GRK2 completely abolished Gαq association to PKCζ (Fig. 7A). Such effect was independent of GRK2 kinase activity and mimicked by its RH domain, a region reported to specifically interact with Gαq (28). Also, a GRK2 mutant (D110A) which is unable to interact with Gαq (28) barely interfered with formation of the Gαq/PKCζ complex (Fig. 7B). The negative regulation exerted by GRK2 was also detected in a natural cell milieu, as assessed through the Venus-YFP PCA (Fig. 7C). On the contrary, as observed for other Gαq effectors (29), PKCζ was not displaced by the Gαq regulators RGS2 or 4 (Fig. 7, D and E).

In agreement with the ability to inhibit Gαq/PKCζ interaction, enhanced GRK2 levels in CHO-M3 cells abolished carbachol-induced ERK5 activation (Fig. 8A). ERK5 activation was reduced to ~50% upon expression of the RH domain of GRK2 (Fig. 8B), whereas a kinase-inactive GRK2-K220R mutant did not disrupt ERK1/2 signaling as compared with wild-type GRK2 (Fig. 8C). This suggests that direct Gαq binding plays a role in the attenuation of ERK5 signaling by GRK2 in addition

# A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 8. GRK2 is a negative regulator of Gq-PCR-mediated ERK5 activation.** A, GRK2 overexpression abolishes ERK5 activation by the Gq-coupled M3 receptor. CHO-M3 cells were transfected with empty vector (pcDNA3), HA-ERK5, and GRK2, serum-starved and stimulated with carbachol (10  $\mu$ M). ERK5 stimulation was assessed as in Fig. 5 (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments) (\*,  $p < 0.05$ ; two tailed  $t$  test). B, GRK2 RH domain overexpression partially abolishes ERK5 activation by the Gq-coupled M3 receptor. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5 and pcDNA3, GRK2 wt or the GRK2-RH domain. Samples were processed as above for ERK5 activation. Blots shown are representative of two independent experiments and display the calculated fold-induction. C, Gq-PCR-triggered ERK1/2 activation is not affected by a kinase-deficient GRK2 mutant. CHO-M3 cells were transfected with Gαq and either pcDNA3, GRK2, or GRK2-K220R, and treated as above followed by analysis of ERK1/2 activation. Data were normalized to pcDNA3 transfection. Blot is representative of four independent experiments and display the calculated fold-induction. D, a GRK2 association-deficient Gαq mutant enhances ERK5 activation. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5 and either Gαq wt or Gαq Y261F (deficient in GRK2 binding) and processed as in A (\*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , two tailed  $t$  test). E, Gαq mutant with diminished GRK2-association ability shows increased co-immunoprecipitation with ERK5. CHO-M3 cells were transfected with HA-ERK5 and either Gαq wt or Gαq-Y261F. Cell lysates and HA-ERK5 immunoprecipitates were analyzed. Data (mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments) were normalized with respect to ERK5/Gαq wt co-immunoprecipitation (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

to kinase-dependent GPCR desensitization. Consistently, the duration and amplitude of carbachol-induced ERK5 activation (Fig. 8D), as well as the assembly of Gαq/ERK5 multimolecular complexes (Fig. 8E) were markedly enhanced when expressing a GRK2 binding-deficient mutant of Gαq (Gαq-Y261F).

**Gαq Is Involved in Apoptotic Cell Death Promotion via PKCζ**—The description of PKCζ as an effector protein for Gαq suggested that it might underlie specific cellular functions promoted by the G protein. Since cell death promotion is a well-established Gαq-initiated process ((21) and references therein), we compared cell viability in CHO cells expressing Gαq wt or the Gαq-EEAA mutant upon long-term growth in low serum (3% FBS). Cell death took place earlier in Gαq-overexpressing cells compared with control and Gαq-EEAA populations, both of which initiated this process in a similar timeframe (Fig. 9A). The clear increase in cell death promoted by a constitutively active Gαq mutant (Gαq-R183C) was attenuated when introducing the EEAA mutation (which reduces the interaction with PKCζ) and, contrarily, it was enhanced by the Y261F mutation (that potentiates the PKCζ interaction) (Fig. 9B), consistent with a role for the Gq/PKCζ signaling axis in triggering this process. Such impaired ability of the Gαq-EEAA mutant to promote cell death was also observed in HeLa cells (data not shown). Moreover, cell death upon constitutively active Gαq overexpression in CHO cells was neither affected by a mutation that impairs PLCβ activation (R256/T257-AA Ref. 22) (Fig. 9C) nor by PLCβ pharmacological inhibition (Fig. 9D). On the other hand, either ERK5 inhibition or co-expression of the PB1

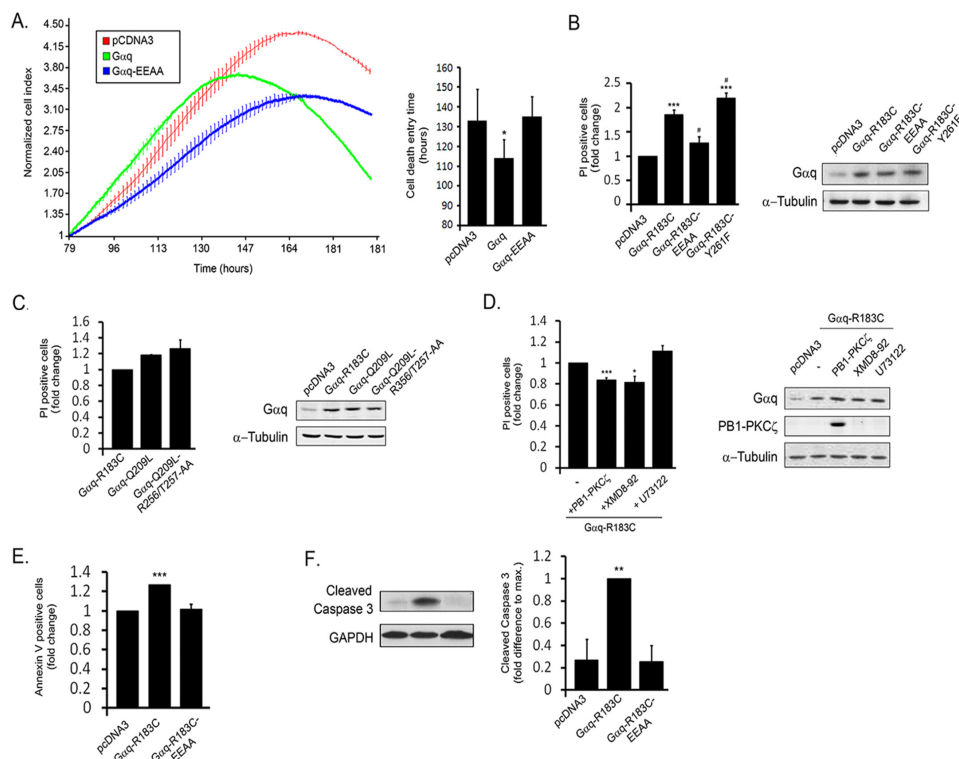
domain of PKCζ showed an inhibitory effect on Gαq-induced cell death (Fig. 9D), suggesting that this Gαq-initiated process is, at least in part, dependent on PKCζ-mediated activation of ERK5. The phenotype observed was determined to be apoptotic cell death, as both annexin V staining and caspase 3 cleavage were enhanced upon Gαq-R183C overexpression and abrogated by the EEAA mutation (Fig. 9, E and F). Taken together, these data reveal that the novel binding region of Gαq is involved in the promotion of apoptotic cell death via PKCζ.

## Discussion

Emerging evidence indicates that activated Gαq subunits can interact with several effector proteins to trigger signaling pathways different from the canonical PLCβ cascade. Previously, we reported a direct, activation-dependent association between Gαq and PKCζ in the context of Gq-coupled GPCR-mediated activation of ERK5 (8). These data suggested a genuine G protein-effector interaction although a causal relationship between the formation of a Gαq/PKCζ complex and Gαq-dependent functional outputs remained to be established. Herein we provide conclusive evidence showing that PKCζ acts as a Gαq effector through the engagement of a novel binding region in the α subunit leading to ERK5 activation and apoptotic cell death.

First, we show that the basic PB1-type II domain of PKCζ, governed by the Lys-19 residue, is critical for the association with Gαq. This region was found to mediate protein-protein interactions of PKCζ that are involved in NFκB activation or

# A Novel Binding Region in Gαq



**FIGURE 9. The Gαq/PKCζ complex is involved in apoptotic cell death.** A, PKCζ-association impairing mutations abolish Gαq-induced cell death. CHO-M3 cells were transfected with GFP and either pcDNA3 empty vector, Gαq wild-type, or the Gαq-E234/E245-AA (Gq-E234/E245-AA) mutant. GFP-positive cells were sorted, seeded onto 96-well sensor plates and monitored with the X-Celligence system for over 140 h. Cell death entry time was determined as the inflection point at which the cell index shifts to negative values (see "Experimental Procedures"). Data were the mean ± S.E. of five independent experiments (\*,  $p < 0.05$ , two tailed  $t$  test). B, constitutively active Gαq mutants with diminished (E234/E245-AA) or enhanced (Y261F) PKCζ association ability decrease and increase cell death, respectively. CHO-M3 cells were transfected and cultured in 0.1% FBS for 48 h. The proportion of transfectants (GFP-positive cells) that show propidium iodide-positive staining was determined through flow cytometry (mean ± S.E. of three independent experiments) (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , two tailed  $t$  test over pcDNA3; #,  $p < 0.05$  over Gαq-R183C). C, Gαq mutation that impairs PLCβ activation does not affect cell death promotion. PI-positive cells were determined in populations overexpressing constitutively active Gαq (Gαq-R183C or Gαq-Q209L) or a mutant with impaired PLCβ activation (Gαq-Q209L-R256/T257-AA) and expressed as fold over Gαq-R183C-transfected cells. D, Gαq-induced cell death is decreased by PKCζ-PB1 domain overexpression or by an ERK5 inhibitor (XMD8-92), but not by a PLCβ inhibitor (U73122). PI-positive cells were quantified as before in populations overexpressing Gαq-R183C and treated with the indicated modulators (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , two tailed  $t$  test over Gαq-R183C). E and F, PKCζ-association impairing mutations abolish constitutively active Gαq-induced apoptosis. Assays were carried out as above. GFP-positive cells that show annexin V staining were measured by flow cytometry and the data are expressed as fold over empty vector-transfected cells (mean ± S.E. of three independent experiments) (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; two tailed  $t$  test over pcDNA3). Cleaved caspase-3 was detected with a specific antibody (mean ± S.E. of three independent experiments) (\*\*,  $p < 0.005$ ; two tailed  $t$  test with respect to Gαq-R183C). Representative Western blots to confirm the expression of the different plasmids in the experiments are shown.

cell polarity establishment (30), and also in ERK5 activation by EGF (17). Our finding is consistent with the fact that independent expression of the PKCζ PB1 domain inhibited Gq-GPCR-mediated ERK5 stimulation (8). Second, we describe a novel binding region in Gαq driving the interaction with PKCζ which is different from the classical effector-binding region and shows surprising sequence similarities to PB1-type I domains.

Overall, the fact that the PKCζ interaction residues in Gαq lie in the vicinity of the classical effector-binding region, supports our conclusion that PKCζ is a *bona-fide* effector of Gαq that associates with a subset of amino acids that are distinct from the binding determinants of other Gαq binding partners (PLCβ, GRK2, and p63RhoGEF). All effectors of Gα subunits invariably

associate with the extended region comprising the C-terminal half of the α2 helix, together with the α3 helix and its junction with the β5 strand, although the subsets of crucial amino acids for these associations vary with the specific effector (31). Interestingly, residues 221–245 of Gαq, which include the PKCζ-binding region but not the classical effector-binding residues, has been recently identified to mediate association with the cold-activated channel TRPM8, a novel Gαq interaction partner (32). This supports the characterization of this Gαq region as a functional module capable of binding different cellular proteins.

Our data show that Gαq strictly depends on the association with PKCζ to promote ERK5 activation. Indeed, the E234/E245-AA

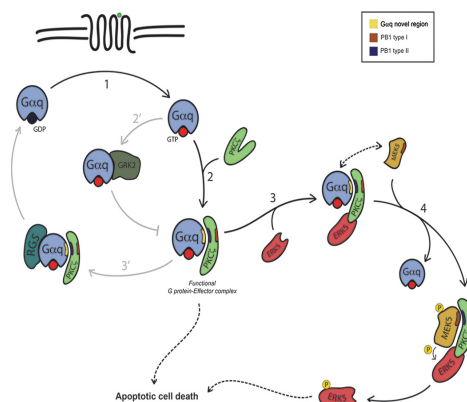


# A Novel Binding Region in Gαq

mutation in Gαq abrogated both direct and receptor-induced ERK5 phosphorylation, whereas ERK1/2 activation remained unaffected. Importantly, we demonstrate that Gαq and ERK5 are found together in an activation-dependent multimolecular complex orchestrated through PKCζ scaffolding, which directly binds ERK5 and enables the stimulation of the pathway. This scaffold role was supported by the finding that Gq-coupled GPCRs do not promote phosphorylation-dependent activation of PKCζ (8). Instead we observed (data not shown) that carbachol induces dimerization of the kinase at a coincident time-course to the Gαq-PKCζ interaction. This could be relevant since dimerization not only is a common scaffold protein mechanism but, in the case of PB1-PB1 associations, it has recently been shown to promote PKCζ activation independent of phosphorylation (33). Indeed, Par6 interaction with PKCζ induces its allosteric activation through the displacement of the PKCζ pseudo-substrate region from the active site (33). Interestingly, Gαq-mediated activation of effectors PLCβ (34) or p63RhoGEF (23) involves the allosteric relief of an auto-inhibitory loop buried within the active region. Thus, it is possible that a PB1-domain-dependent relief of pseudo-substrate auto-inhibition in PKCζ could be induced upon Gαq binding or upon GPCR-induced dimerization. It is tempting to suggest that PB1-driven PKCζ scaffolding might be a cellular mechanism for imposing spatial and temporal specificity during Gαq-initiated signaling.

The regulation of Gαq/effector complexes by GRK2 is a well-established process for dampening downstream signaling. We show that GRK2 impedes the association of PKCζ with Gαq in living cells, and abrogates ERK5 activation due to G protein sequestering and receptor desensitization, as reported for other Gαq/effector complexes (35). Coincidentally, we show that the impairment of the GRK2/Gαq interaction with a specific association-deficient Gαq mutant (Y261F) greatly enhances Gαq interaction with PKCζ and its presence in ERK5 complexes, thus promoting ERK5 activation. These findings strengthen the role of PKCζ as a novel Gαq effector and suggest that Gαq signaling toward the PKCζ/ERK5 pathway could be effectively modified in pathophysiological contexts where GRK2 expression and/or functionality is altered (36).

Finally, we put forward the assembly of Gαq/PKCζ complexes as an important process for the promotion of apoptotic cell death by Gαq. The increase in cell death promoted by the presence of constitutively-active Gαq was abolished by the EEAA mutation (which blocks the assembly of Gαq/PKCζ complexes), so cells expressing the Gαq-EEAA mutant displayed a higher viability than those expressing Gαq wild-type. On the contrary, the presence of the GRK2-association deficient Gαq mutation Y261F (leading to increased complex formation) potentiated cell death. This process is conserved in HeLa cells, and was characterized as apoptosis-mediated cell death, consistent with the reported role for Gαq in the promotion of apoptosis (37). In line with the notion that PKCζ is as a key effector in this process, the overexpression of the PKCζ-PB1 domain decreased Gαq-promoted cell death, whereas neither PLCβ inhibitors nor Gαq mutants that cannot activate PLCβ have an effect. These results are in agreement with previous reports showing that caspase activation and apoptosis



**FIGURE 10. Mechanistic model for the activation of the Gαq/PKCζ/ERK5 axis by Gq-coupled GPCRs.** Proposed sequential formation of protein complexes involved in the Gαq-ERK5 pathway. See text for detailed information.

promoted by activated Gαq is not blocked by inhibitors of IP<sub>3</sub>- or PKC-dependent signaling (38). Also, the role of PKCζ as a pro-apoptotic protein appears to have a crucial effect on the repression of tumorigenesis in ovarian (39) and prostate cancer (40). Interestingly, pharmacological blockade of ERK5 partly inhibited cell death promotion downstream of the Gq/PKCζ axis. Although ERK5 is a well-known pro-survival factor in several contexts (41), it also has been shown to positively regulate apoptosis of medulloblastoma cells (42) and thymocytes (43). However, we cannot rule out that, alongside ERK5, other yet unidentified pathways downstream the Gαq/PKCζ axis would play a role in this process.

In sum, we propose the following mechanistic model for the Gαq/PKCζ axis (Fig. 10): Ligand binding to the receptor causes Gq activation (step 1) which, in turn, promotes the interaction between the PB1 domain type II of PKCζ and the novel effector-binding region of Gαq-GTP (step 2). This would lead to PKCζ allosteric activation, dimer/oligomerization and to the exposure of its kinase domain to interact with ERK5, which is recruited into a multimolecular complex together with Gαq (step 3). Next, MEK5 would be attracted into an intermediate signaling complex through a direct interaction with Gαq (8) which would rapidly progress into MEK5 displacing Gαq from its binding site on PKCζ (step 4). Subsequently, the interaction between MEK5 and PKCζ would favor the autophosphorylation of MEK5, which will, in turn, phosphorylate and activate ERK5 (step 5) (17). Additionally, GRK2 and RGS proteins would act as negative modulators of this cascade by sequestering Gαq away from PKCζ (step 2'), or by binding to Gαq in complex with PKCζ to promote GTPase activity and deactivation of the Gα subunit (step 3'), respectively. Finally, we postulate that the promotion of apoptotic cell death may depend both on ERK5 and other yet uncharacterized targets downstream the Gαq/PKCζ complex. This model may serve as a theoretical framework for subsequent studies of this signaling axis and contribute to revise the functional consequences of Gαq activation.

## A Novel Binding Region in Gαq

**Author Contributions**—G. S. F., S. C., C. G. H., F. M., and C. R. designed experiments. G. S. F., S. C., A. C., G. G. T., J. K., and C. G. H. performed experiments. S. W. M. designed the PCA approach. G. S. F., F. M., and C. R. wrote the manuscript.

**Acknowledgments**—We thank Durga Sivanesan for extraordinary help, and Susana Rojo, Almudena Santos, and Paula Ramos for helpful technical assistance.

### References

- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 639–650
- Rhee, S. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C $\alpha$ . *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312
- Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M. R., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C. R., Neubig, R. R., Wieland, T., and Tesmer, J. J. G. (2007) Structure of Gαq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**, 1923–1927
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134–11139
- Sprang, S. R., Chen, Z., and Du, X. (2007) Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric Gα proteins. *Adv. Protein Chem.* **74**, 1–65
- Sánchez-Fernández, G., Cabezu, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Araya, A. M., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2014) Gαq signalling: The new and the old. *Cell Signal.* **26**, 833–848
- Turjanski, A. G., Vaqué, J. P., and Gutkind, J. S. (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**, 3240–3253
- García-Hoz, C., Sánchez-Fernández, G., Díaz-Meco, M. T., Moscat, J., Mayor, F., and Ribas, C. (2010) Gα(q) acts as an adaptor protein in protein kinase C ζ (PKCζ)-mediated ERK5 activation by G protein-coupled receptors (GPCR). *J. Biol. Chem.* **285**, 13480–13489
- García-Hoz, C., Sánchez-Fernández, G., García-Escudero, R., Fernández-Velasco, M., Palacios-García, J., Ruiz-Meana, M., Díaz-Meco, M. T., Leitges, M., Moscat, J., García-Dorado, D., Bosá, L., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2012) Protein kinase C (PKC)ζ-mediated Gαq stimulation of ERK5 protein pathway in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **287**, 7792–7802
- Remy, I., and Michnick, S. W. (2004) Mapping biochemical networks with protein-fragment complementation assays. *Methods Mol. Biol.* **261**, 411–426
- Chan P, Gabay M, Wright FA, Kan W, Oner SS, Lanier SM, Smrcka AV, Blumer JB, Tall GG: (2011) Purification of heterotrimeric G protein α subunits by GST-Ric-8 association: primary characterization of purified Gα(olf). *J. Biol. Chem.* **286**, 2625–2635
- Tall GG, Krumins AM, Gilman AG: (2003) Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric Gα protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 8356–8362
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., and Pauwels, P. (2012) Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS ONE* **7**, e46536
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., and Abassi, Y. A. (2011) The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol. Biol.* **740**, 33–43
- Sumimoto, H., Kamakura, S., and Ito, T. (2007) Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebae, and plants. *Sci. STKE* **2007**, re6
- Moscat, J., Díaz-Meco, M. T., Albert, A., and Campuzano, S. (2006) Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol. Cell* **23**, 631–640
- Díaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2001) MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1218–1227
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2005) Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. *J. Biol. Chem.* **280**, 9653–9661
- Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004) Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5. *J. Biol. Chem.* **279**, 31883–31890
- Medina, R., Grishina, G., Meloni, E. G., Muth, T. R., and Berlot, C. H. (1996) Localization of the effector-specifying regions of Gi2α and Gqα. *J. Biol. Chem.* **271**, 24720–24727
- Sánchez-Fernández, G., Cabezu, S., García-Hoz, C., Benincá, C., Araya, A. M., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2014) Gαq signalling: the new and the old. *Cell Signal.* **26**, 833–848
- Fan, G., Ballou, L. M., and Lin, R. Z. (2003) Phospholipase C-independent activation of glycogen synthase kinase-3β and C-terminal Src kinase by Gαq. *J. Biol. Chem.* **278**, 52432–52436
- Shankaranarayanan, A., Boguth, C. A., Lutz, S., Vettel, C., Uhlemann, F., Aittaleb, M., Wieland, T., and Tesmer, J. J. G. (2010) Gαq allosterically activates and relieves autoinhibition of p63RhoGEF. *Cell Signal.* **22**, 1114–1123
- Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T., and Tesmer, J. J. G. (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Gαq-GRK2-Gβγ complex. *Science* **310**, 1686–1690
- Sánchez-Fernández, G., Cabezu, S., García-Hoz, C., Tobin, A. B., Mayor, F., Jr., and Ribas, C. (2013) ERK5 Activation by Gq-coupled muscarinic receptors is independent of receptor internalization and β-arrestin recruitment. *PLoS ONE* **8**, e84174
- Nigro, P., Abe, J., Woo, C.-H., Satoh, K., McClain, C., O'Dell, M. R., Lee, H., Lim, J.-H., Li, J., Heo, K.-S., Fujiwara, K., and Berk, B. C. (2010) PKCζ decreases eNOS protein stability via inhibitory phosphorylation of ERK5. *Blood* **116**, 1971–1979
- Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., García-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I., and Mayor, F. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 913–922
- Sterne-Marr, R., Tesmer, J. J. G., Day, P. W., Stracquadanio, R. P., Cilente, J.-A. E., O'Connor, K. E., Pronin, A. N., Benovic, J. L., and Wedegaertner, P. B. (2003) G protein-coupled receptor kinase 2/Gαq/11 interaction. A novel surface on a regulator of G protein signaling homology domain for binding Gα subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 6050–6058
- Shankaranarayanan, A., Thal, D. M., Tesmer, V. M., Roman, D. L., Neubig, R. R., Kozasa, T., and Tesmer, J. J. G. (2008) Assembly of high order Gαq-effector complexes with RGS proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 34923–34934
- Díaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2012) The atypical PKCs in inflammation: NF-κB and beyond. *Immunol. Rev.* **246**, 154–167
- Oldham, W. M., and Hamm, H. E. (2006) Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q. Rev. Biophys.* **39**, 117–166
- Zhang, X., Mak, S., Li, L., Parra, A., Denlinger, B., Belmonte, C., and McNaughton, P. A. (2012) Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Gαq. *Nat. Cell Biol.* **14**, 851–858
- Graybill, C., Wee, B., Atwood, S. X., and Prehoda, K. E. (2012) Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (aPKC) by pseudosubstrate displacement. *J. Biol. Chem.* **287**, 21003–21011
- Waldo, G. L., Ricks, T. K., Hicks, S. N., Cheever, M. L., Kawano, T., Tsuboi, K., Wang, X., Montell, C., Kozasa, T., Sondek, J., and Harden, T. K. (2010) Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-β and Gq signaling complex. *Science* **330**, 974–980
- Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G., Benovic, J. L., and Kozasa, T. (1999) Selective regulation of Gα(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J. Biol. Chem.* **274**, 34483–34492
- Penela, P., Murga, C., Ribas, C., Lafarga, V., and Mayor, F. (2010) The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 821–832
- Adams, J. W., Pagel, A. L., Means, C. K., Oksenberg, D., Armstrong, R. C., and Brown, J. H. (2000) Cardiomyocyte apoptosis induced by Gq signaling

## A Novel Binding Region in $G\alpha_q$

- is mediated by permeability transition pore formation and activation of the mitochondrial death pathway. *Circ. Res.* **87**, 1180–1187
38. Peavy, R., Hubbard, K., and Lau, A., Fields, R. B., Xu, K., Lee, C. J., Lee, T. T., Gernert, K., Murphy, T. J., and Hepler, J. R. (2005) Differential effects of  $Gq(\alpha)$ ,  $G14(\alpha)$ , and  $G15(\alpha)$  on vascular smooth muscle cell survival and gene expression profiles. *Mol. Pharmacol.* **67**, 2102–2114
  39. Nazarenko, I., Jenny, M., Keil, J., Gieseler, C., Weisshaupt, K., Sehouli, J., Legewie, S., Herbst, L., Weichert, W., Darb-Esfahani, S., Dietel, M., Schäfer, R., Ueberall, F., and Sers, C. (2010) Atypical protein kinase  $C\zeta$  exhibits a proapoptotic function in ovarian cancer. *Mol. Cancer Res.* **8**, 919–934
  40. Kim, J. Y., Valencia, T., Abu-Baker, S., Linares, J., Lee, S. J., Yajima, T., Chen, J., Eroshkin, A., Castilla, E. A., Brill, L. M., Medvedovic, M., Leitges, M., Moscat, J., and Diaz-Meco, M. T. (2013) c-Myc phosphorylation by PKC $\zeta$  represses prostate tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 6418–6423
  41. Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E. P., Müller, J., and Cross, M. J. (2012) ERK5: Structure, regulation and function. *Cell Signal.* **24**, 2187–2196
  42. Sturla, L.-M., Cowan, C. W., Guenther, L., Castellino, R. C., Kim, J. Y. H., and Pomeroy, S. L. (2005) A novel role for extracellular signal-regulated kinase 5 and myocyte enhancer factor 2 in medulloblastoma cell death. *Cancer Res.* **65**, 5683–5689
  43. Sohn, S. J., Lewis, G. M., and Winoto, A. (2008) Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **27**, 1896–1906



# **Nuevo interactoma de la proteína Gq y su implicación en la homeostasis vascular**

**Álvaro Caballero Lombraña**  
**Madrid 2020**





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**Universidad Autónoma  
de Madrid**